



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CÉLULAS ESTAMINAIS E A MEDICINA DENTÁRIA – QUE
FUTURO?**

Trabalho submetido por
Patrícia Martins dos Ramos
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

junho de 2018



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

CÉLULAS ESTAMINAIS E MEDICINA DENTÁRIA – QUE FUTURO?

Trabalho submetido por
Patrícia Martins dos Ramos
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Armanda Maria Subtil Amorim Rodrigues de Abreu

e coorientado por
Doutor Pedro Estilita Pereira Monteiro da Cruz

junho de 2018

Dedicatória

Á minha mãe que partilhava este sonho comigo...

Sei que onde quer que estejas olhas por mim e
festejas as minhas vitórias.

Até breve!

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer à minha orientadora, Prof. Doutora Armanda Maria Subtil Amorim Rodrigues de Abreu, por nunca me largar a mão ao longo deste desafio. Obrigada pela amizade, acreditar nas minhas capacidades e por todas as palavras de apoio e incentivo.

Em seguida quero agradecer ao meu pai e irmã por me darem amor, carinho e tranquilidade todos os dias. Vocês são o meu pilar. Obrigada!

Agradeço à Mariana que de desconhecida, passou a ser a minha melhor amiga, a minha companheira de quarto, minha confidente e que sei que daria o mundo por mim!

Quero agradecer também à minha amiga Rosa que mesmo longe está sempre perto do meu coração quando mais preciso.

Às minhas colegas de curso e amigas, Rute Delgado, Ana Rita, Marta Simões e Marta Guia, obrigada pela companhia nas madrugadas de estudo, nos momentos de desespero e nervosismos, mas também nos momentos de diversão e festejos.

Obrigada aos meus dois amigos e vizinhos de residência, Alex Rebocho e Rui Fernandes, por aquela porta do vosso quarto estar sempre aberta e permitir começar o dia da melhor forma com a vossa boa disposição e alegria contagiantes.

Um grande obrigado à Graça Costa por todos os abraços, beijinhos e carinho sempre nos momentos certos.

Por último, mas não menos importante, mas sim porque quero destacar, quero agradecer a uma das pessoas que esteve sempre comigo desde o início da minha jornada académica, a Madalena Martins. A Madalena é sem dúvida das pessoas mais especiais que conheci neste percurso, com um coração tão grande que é capaz de distribuir amor pelo mundo. Obrigada por nunca me deixares ir abaixo e seres a minha mãezinha.

Resumo

Desde a sua descoberta, as células estaminais mesenquimais têm sido exaustivamente estudadas, por possuírem capacidade de auto-renovação, diferenciação em várias linhas celulares e ultrapassando os problemas éticos associado às células estaminais embrionárias. São já conhecidas algumas fontes ricas destas células, mas por vezes a sua acessibilidade encontra-se dificultada. Neste sentido, a procura por outros tipos de células mesenquimais, com características semelhantes, permanece constante.

Mais recentemente foram descobertas células estaminais mesenquimais em tecidos dentários, designadas de células estaminais dentárias, que inclui células estaminais da polpa dentária (DPSCs), células estaminais de dentes decíduos esfoliados (SHED), células estaminais da papila apical (SCAP), células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs) e células precursoras do folículo dentário (DFPCs).

A descoberta destas células originou um novo impulso na Engenharia de Tecidos e Terapia Celular, devido à sua facilidade de obtenção e às propriedades semelhantes, ou até mesmo melhoradas, em relação às células estaminais mesenquimais já estudadas.

Nesta revisão são abordadas as propriedades individuais de cada célula estaminal mesenquimal dentária e apresentados vários estudos que apoiam a futura aplicabilidade clínica na regeneração/reparação de tecidos orais, extra-orais e tratamento de doenças.

Palavras-chave: Células estaminais mesenquimais, células estaminais dentárias, medicina dentária regenerativa, Engenharia de Tecidos

Abstract

Since its discovery, mesenchymal stem cells have been extensively studied because they have the capacity for self-renewal, differentiation into different cell lines, and to overcome the ethical problems associated with embryonic stem cells. Some rich sources of these cells are already known, but sometimes their accessibility is hard. In this sense, the search for other types of mesenchymal cells, with similar characteristics, remains constant.

More recently, mesenchymal stem cells have been discovered in dental tissues, called dental stem cells, which includes dental pulp stem cells (DPSCs), excised deciduous stem cells (SHED), apical papilla stem cells (SCAP), stem cells periodontal ligament (PDLSCs) and dental follicle precursor cells (DFPCs).

The discovery of these cells gave rise to a new impulse in Tissue Engineering and Cell Therapy, due to easiness of production and similar properties, or even improved, in relation to the mesenchymal stem cells already studied.

In this review, the individual properties of each dental mesenchymal stem cells are discussed and several studies presented to support the future clinical applicability in the regeneration / repair of oral, extra-oral tissues and treatment of diseases.

Key words: Mesenchymal stem cells, dental stem cells, regenerative dentistry, Tissue Engineering

Índice

I.	Introdução	9
II.	Desenvolvimento	11
2.1	Odontogénese.....	11
2.2	O dente e as suas estruturas	16
2.3	Células Estaminais.....	23
2.4	Células estaminais dentárias, características e aplicabilidade na Medicina Dentária	27
2.4.1	DPSCs.....	28
2.4.2	SHED.....	44
2.4.3	PDLSCs	49
2.4.4	SCAP	53
2.4.5	DFPCs.....	54
2.5	Aplicações extra-orais das células estaminais dentárias	58
III.	Conclusão	67
IV.	Bibliografia.....	69

Índice de figuras

Figura 1 – Formação da banda epitelial primaria às 6 semanas de gestação.	11
Figura 2 – Divisão da banda epitelial primaria nas lâminas dentária e vestibular às 7 semanas de gestação	11
Figura 3 – Fase de botão dentário	12
Figura 4 – Fase de capuz	13
Figura 5 – Fase de campânula ou sino.....	13
Figura 6 – Fase de campânula avançada ou coroa	14
Figura 7 – Formação da raiz num estadio mais inicial (A) e mais tardio (B)	15
Figura 8 – O dente e as suas estruturas de suporte	16
Figura 9 - Esquema do órgão pulpar que mostra a arquitetura da polpa	18
Figura 10 - Esquema representativo da localização das fibras principais	21
Figura 11 - Características das células estaminais	23
Figura 12 - Estádios iniciais do desenvolvimento embrionário	24
Figura 13 - Fontes de células estaminais adultas na cavidade oral	28
Figura 14 - Potencial de diferenciação das DPSCs <i>in vitro</i>	29
Figura 15 - Histologia da polpa dentária	31
Figura 16 - Propriedades de diferenciação das linhagens DPSCs e SCAP em comparação com BMSCs	32
Figura 17 - Representação esquemática do modelo animal e do fragmento radicular transplantado para regeneração da polpa/dentina	33
Figura 18 - Análise histológica do grupo de controlo	34
Figura 19 - Análise histológica da regeneração de dentina/polpa in vivo usando SCAP	35
Figura 20 - Análise histológica da regeneração de dentina/polpa in vivo usando DPSC.	35
Figura 21 - Relação da área regenerada com a área do canal radicular no dia 14	36
Figura 22 - Regeneração do tecido pulpar no canal radicular vazio após pulpectomia em cães	37
Figura 23 - Fragmento modelo de canal radicular.....	38
Figura 24 - Fragmento de raiz contendo DPSCs 10 semanas pós-operatório	38
Figura 25 - Radiografias pré-operatórias e pós-operatórias	40
Figura 26 - Avaliação histológica da regeneração do tecido pulpar	41

Figura 27 - Radiografias representativas dos locais de teste (T) e controlo (C) de um paciente, antes e após a cirurgia	43
Figura 28 - Esquema representativo da metodologia usada e os resultados obtidos 3 anos após os enxertos	43
Figura 29 - Caracterização das SHED	45
Figura 30 - SHED transplantadas num ratinho imunocomprometido	45
Figura 31 - Diagrama esquemático da estratégia para engenharia do tecido pulpar	46
Figura 32 - Diferenciação das SHED em odontoblastos após o transplante	47
Figura 33 - Gráfico representativo do número total de microvasos, em fatias de dentes/ <i>scaffolds</i> cultivadas com células SHED sozinhas, SHED e HDMEC ou com <i>scaffolds</i> vazios	47
Figura 34 - Engenharia do tecido pulpar dentário com SHED injetadas em canais radiculares humanos e transplantadas em ratos imunocomprometidos	49
Figura 35 - Ilustração do modelo experimental de defeito periodontal.....	50
Figura 36 - Avaliação da regeneração periodontal	51
Figura 37 - Criação do modelo de periodontite em Beagles	52
Figura 38 - Imagens micro-CT dos resultados obtidos 8 semanas após a transplantação	52
Figura 39 - Análise histológica raiz dentária formada <i>in vivo</i>	56
Figura 40 - Possível regeneração de vários tecidos ou órgãos recorrendo ao uso de células estaminais dentárias	58
Figura 41 - Fotografias representativas dos olhos dos coelhos um mês após as queimaduras oculares (A1-E1) e três meses após o transplante da folha de engenharia de tecidos contendo DPSCs humanas (A2-E2)	61
Figura 42 - Resultados da análise funcional dos grupos DMEM (controlo) e HDPC, 35 dias após o tratamento	62
Figura 43 - RT-PCR de marcadores de células pancreáticas	63
Figura 44 - Gráficos quantitativos de insulina e péptido-C produzidos pelas células diferenciadas em ilhotas pancreáticas, após estimulação com glicose	63
Figura 45 - Gráficos representativos do número de células β obtidas pela diferenciação de SHED e DPSCs (A) e a comparação de glucose no sangue nos ratos controlo e nos ratos transplantados com células β (B)	64

Índice de tabelas

Tabela 1 - Resumo do local de inserção e respectivas funções das fibras principais	22
Tabela 2 - Avaliação clínica e radiográfica dos 3 grupos, 24 semanas após transplantação	39
Tabela 3 - Análise estatística dos 3 grupos, antes e após 24 semanas a transplantação. Grupo 1 (cDPSC/Gelfoam), Grupo 2 (Gelfoam) e grupo 3 (cDPSC). FW, largura do forame; RL, comprimento da raiz; WT, a espessura da parede	40
Tabela 4 - Características das células estaminais derivadas de tecidos dentários	57
Tabela 5 - Análise radiográfica da calota craneana de ratos 4 a 8 semanas após a cirurgia	60

Lista de abreviaturas e siglas

ASCs – do inglês *adult stem cells* (células estaminais adultas)

BMP-2 – do inglês *bone morphogenic protein-2* (proteína morfogénica óssea 2)

CD - Antígeno de diferenciação celular

DFPCs – do inglês *dental follicle precursor cells* (células precursoras do folículo dentário)

DPSCs – do inglês *dental pulp stem cells* (células estaminais da polpa dentária)

ESC – do inglês *embryonic stem cells* (células estaminais embrionárias)

HA - do inglês *hydroxyapatite* (hidroxiapatite)

IPSCs – do inglês *induced pluripotent stem cells* (células estaminais pluripotentes induzidas)

MSCs – do inglês *mesenchymal stem cells* (células estaminais mesenquimais)

MTA – do inglês *mineral trioxide aggregate* (agregado mineral trióxido)

OCT-4 – Factor de transcrição Octamer-4

PDLSCs – do inglês *periodontal ligament stem cells* (células estaminais do ligamento periodontal)

PGA – do inglês *polyglycolic acid* (ácido poliglicólico)

PLG – do inglês *poly (D,L-lactide-co-glycolide)* (poli (D,L-lactico-co-glicólico))

PLGA – do inglês *poly (lactide-co-glycolic) acid* (poli (ácido láctico-co-glicólico))

PLLA – do inglês *poly (L-lactic acid)* (poli (L-ácido láctico))

SCAP – do inglês *stem cells apical papilla* (células estaminais da papila apical)

SHED – do inglês *stem cells from human exfoliated deciduous teeth* (células estaminais de dentes decíduos esfoliados)

SOX2 – Factor de transcrição das ESC

STRO-1 – Marcador celular de percursores do estroma (MSC).

TCP – do inglês *tricalcium phosphate* (fosfato tricálcico)

I. Introdução

A dentição apresenta propriedades mecânicas notáveis, no entanto esta encontra-se predisposta diariamente não só a traumas mecânicos, mas também a químicos, a bactérias e a doenças congénitas. A dentição humana desempenha um papel deveras importante na mastigação, fonação e na estética. Assim, defeitos dentários ou a perda de dentes leva consequentemente a uma redução acentuada da qualidade de vida. Neste sentido é crucial estabelecer estratégias cada vez mais promissoras e eficientes para restabelecer a harmonia funcional e estética (Amrollahi, Shah, Seifi, & Tayebi, 2016).

Infelizmente a perda de dentes é uma situação muito frequente que resulta de diversas patologias e adversidades, tais como, doenças periodontais, cáries severas, fraturas radiculares ou até mesmo de alterações genéticas. Durante anos, a Medicina Dentária convencional apenas oferecia como tratamentos dentários a estes infortúnios, as restaurações, extrações e a sua subsequente substituição com próteses. Atualmente, a osteointegração de implantes para substituição de peças dentárias, enxertos ósseos e biomateriais osteocondutores, vieram acrescer o leque de soluções da Medicina Dentária. No entanto, estas medidas terapêuticas, por vezes revelam-se ineficazes na restituição da integridade funcional e estética concedida pela dentição natural (H. Liu & Cao, 2010; Shilpa, Kaul, Sultana, & Bhat, 2013).

Com os mais recentes avanços na biologia celular/molecular e a importante descoberta das células estaminais, desenvolveram-se novas estratégias terapêuticas que visam a regeneração de tecidos danificados, em vez de os substituir. As células estaminais são definidas como células com potencial de se diferenciarem em várias linhagens celulares e de se renovarem indefinidamente (Honda, Imaizumi, Tsuchiya, & Morsczeck, 2010). Desde então, os estudos com células estaminais cresceram exponencialmente devido às suas características promissoras para inúmeras aplicações nas mais diversas áreas da investigação, tais como na Medicina Regenerativa, Engenharia de Tecidos, Terapia Genética e terapias de reposição celular. Através de estudos realizados, é notório que a utilização de células estaminais é uma mais valia no combate a doenças graves, como doenças hematológicas, cardiovasculares, musculares e neurológicas (Brignier & Gewirtz, 2010; Choumerianou, Dimitriou, & Kalmanti, 2008; Estrela, de Alencar, Kitten, Vencio, & Gava, 2011).

Devido ao grande potencial terapêutico das células estaminais, desencadeou-se a procura incansável por mais fontes ricas nestas células, sendo que na última década foi descoberta a existência de células estaminais em diversos tecidos orais, ao qual atribuíram-lhes o nome de células estaminais dentárias (Egusa, Sonoyama, Nishimura, Atsuta, & Akiyama, 2012).

As células estaminais são um campo em expansão em várias áreas da medicina, entre elas a Medicina Dentária. Na Medicina Dentária, a atenção para as células estaminais centra-se na tentativa da regeneração dos tecidos orais danificados, como por exemplo, o complexo dentina-polpa e o ligamento periodontal (Bossú *et al.*, 2014; Egusa *et al.*, 2012; Shilpa *et al.*, 2013).

A perda de dentes leva a uma reabsorção óssea contínua, principalmente a nível da mandíbula ao longo da vida. Desta maneira torna-se difícil restabelecer a dentição com implantes dentários ou até mesmo com próteses. Neste sentido, espera-se que com a conjugação do uso de células estaminais aliadas à Medicina Dentária, seja possível regenerar defeitos nos tecidos periodontais, osso alveolar ou até futuramente restabelecer um dente novo por inteiro (Bossú *et al.*, 2014; Egusa *et al.*, 2012; Shilpa *et al.*, 2013).

Com esta revisão bibliográfica pretendo dar a conhecer as diferentes células estaminais dentárias, as suas fontes de isolamento na cavidade oral, as suas características, potencialidades já demonstradas através de estudos científicos, e ainda, demonstrar e sensibilizar para a importância da recolha e uso destas células em futuras terapias dentárias e no tratamento de diversas patologias.

II. Desenvolvimento

2.1 Odontogênese

A odontogênese é um processo contínuo e complexo de formação dentária.

É por volta das 6 semanas de gestação que se inicia o processo de odontogênese, com a migração das células da crista neural para a região do epitélio oral (que passam a chamar-se de células ectomesenquimais) e com a proliferação das células do epitélio oral. Esses locais específicos de proliferação resultam na formação da banda epitelial primária, que invade o ectomesênquima subjacente, colonizado pelas células ectomesenquimais. Essas bandas apresentam-se em forma de ferradura e correspondem à futura posição dos arcos dentários dos maxilares superior e inferior (Chiego, 2014; Kumar, 2011; Nanci, 2013).

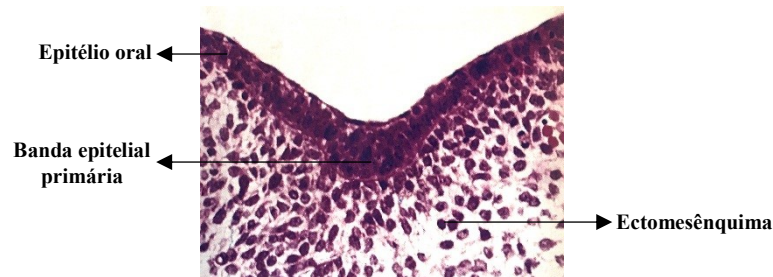


Figura 1 – Formação da banda epitelial primaria às 6 semanas de gestação. Adaptado de (Katchburian & Arana, 2017).

Na 7^a semana de gestação, a banda epitelial subdivide-se e diferencia-se em dois processos: a lâmina dentária e lâmina vestibular. A lâmina dentária forma-se primeiramente, assumindo uma posição mais interna (lingual) e logo de imediato forma-se a lâmina vestibular, com uma posição mais externa (bucal) (Kumar, 2011; Nanci, 2013).

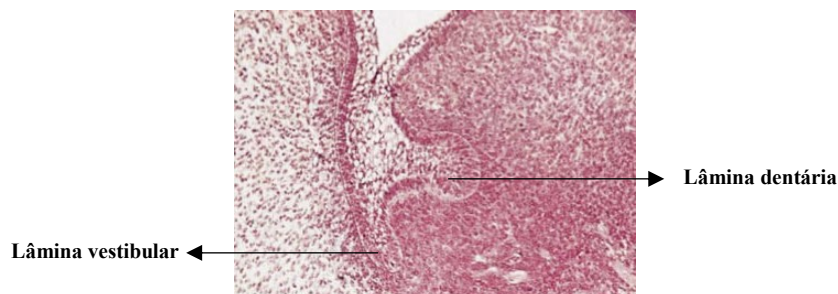


Figura 2 – Divisão da banda epitelial primaria nas lâminas dentária e vestibular às 7 semanas de gestação. Adaptado de (Berkovitz, Holland, & Moxham, 2004).

A lâmina vestibular cresce de forma rápida, mas posteriormente sofre degeneração, formando uma fenda que se tornará o vestíbulo oral entre as zonas alveolares e os lábios e bochecha (Nanci, 2013).

Embora a odontogénese seja um processo contínuo, o desenvolvimento dentário é dividido por aspectos morfológicos em vários estádios, denominados de fase de botão, fase de capuz, fase de campânula ou sino, fase de campânula avançada e risogénese (Kumar, 2011; Nanci, 2013).

A fase de botão ou broto caracteriza-se pela proliferação das células da lâmina dentária, formando inchaços arredondados ou ovoides, nas posições dos futuros dentes decíduos. O crescimento do botão dentário arrasta a lâmina dentária consigo, ficando preso a esta por uma extensão chamada de lâmina lateral. Cada um desses pequenos crescimentos da lâmina dentária representa o início do órgão de esmalte (Kumar, 2011; Nanci, 2013).

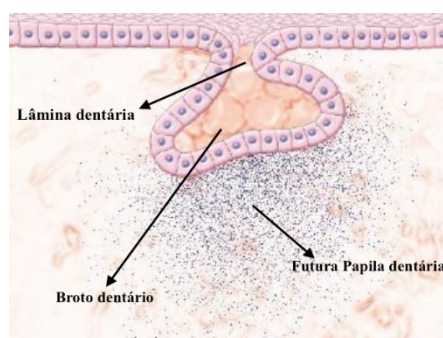


Figura 3 – Fase de botão dentário. Adaptado de (Chiego, 2014).

A proliferação celular de cada órgão de esmalte continua a penetrar cada vez mais no ectomesenquima, adquirindo uma nova forma, devido ao crescimento diferencial. Esse crescimento desigual dá início ao estágio de capuz, que se caracteriza pela formação de uma concavidade na superfície profunda do botão dentário. Nessa concavidade as células ectomesenquimais que circundam o botão dentário condensam-se formando a papila dentária. Este estágio de desenvolvimento é designado de capuz devido à localização do órgão de esmalte sobre a papila dentária, como se de uma touca ou capuz se tratasse. Outras células ectomesenquimais agrupam-se na periferia do órgão de esmalte e da papila dentária formam uma nova estrutura - o folículo dentário (Kumar, 2011; Nanci, 2013). O órgão de esmalte, a papila dentária e o folículo dental constituem o germe dentário. O órgão de esmalte forma o esmalte, a papila dentária origina a dentina e polpa, ao passo que o folículo dentário é responsável pela formação dos tecidos de suporte do dente (Kumar, 2011; Nanci, 2013).

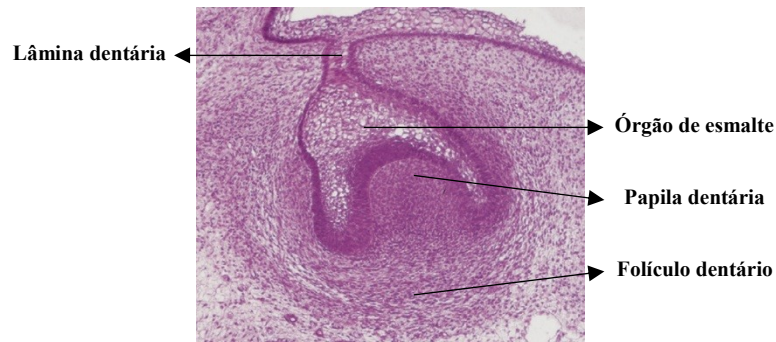


Figura 4 – Fase de capuz Adaptado de (Nanci, 2013).

O crescimento contínuo do germe dentário leva à próxima fase do desenvolvimento do dente, o estadiu de campânula ou sino, à medida que a depressão ocupada pela papila dentária afunda-se no órgão de esmalte (Kumar, 2011; Nanci, 2013).

É neste estadiu que a forma da coroa é determinada e as células do órgão de esmalte sofrem histodiferenciação, formando duas estruturas: o epitélio externo do órgão de esmalte e o epitélio interno do órgão de esmalte. Os epitélios externos e internos do órgão de esmalte são contínuos, no entanto, o epitélio interno inicia-se no ponto em que o epitélio externo se curva para formar a concavidade, na qual as células da papila dentária acumulam-se. O epitélio externo representa as células periféricas que cobre a restante estrutura do órgão de esmalte. A junção entre o epitélio do esmalte interno e externo é chamada de alça cervical e é uma área de intensa atividade mitótica (Chiego, 2014; Nanci, 2013).

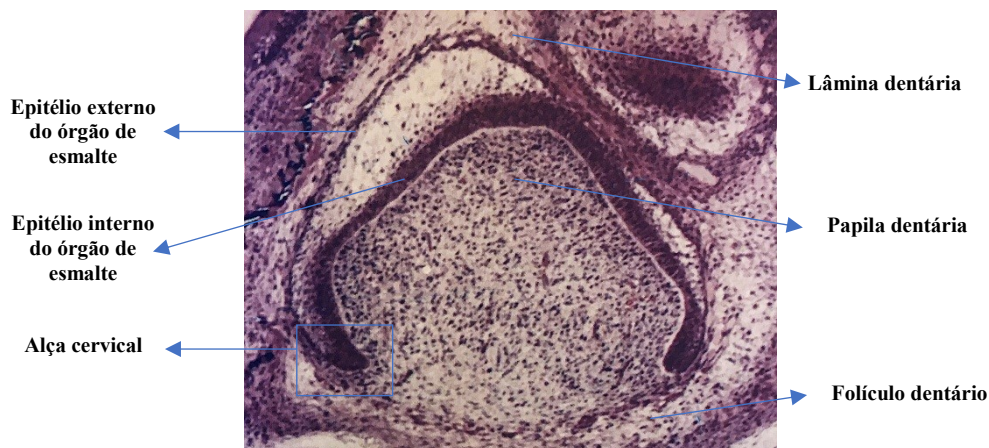


Figura 5 – Fase de campânula ou sino. Adaptado de (Katchburian & Arana, 2017).

É nesta fase que ocorre importantes diferenciações celulares por meio de interações recíprocas. Em primeiro, ocorre a diferenciação das células da periferia da papila dentária

em odontoblastos, sob influencia do epitélio interno do órgão de esmalte. Em seguida, esses mesmos odontoblastos vão induzir as células do epitélio interno do órgão de esmalte a converterem-se em ameloblastos (Chiego, 2014).

Ao longo deste desenvolvimento, a lâmina dentária torna-se mais longa e fina, rompendo e assim o órgão de esmalte perde a sua conexão com o epitélio oral. Este acontecimento dá por terminada a fase de campânula (Kumar, 2011).

A fase seguinte é denominada de fase de campânula avançada ou fase de coroa. É a partir deste momento que os odontoblastos começam a síntese da primeira camada de dentina, junto da lâmina basal que separa os ameloblastos dos odontoblastos. A camada de dentina formada induz os ameloblastos a depositar esmalte sobre a dentina, à medida que os ameloblastos migram no sentido oposto aos odontoblastos. A lâmina basal após a formação de esmalte e dentina passa a designar-se de junção amelo-dentinária (Chiego, 2014; Kumar, 2011).

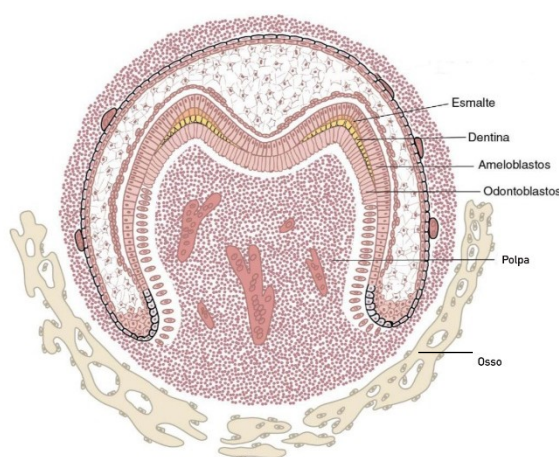


Figura 6 – Fase de campânula avançada ou coroa. Adaptado de (Chiego, 2014).

Uma vez terminada a formação da coroa, as células do epitélio interno e externo do órgão de esmalte continuam a proliferar na região da alça cervical, formando uma dupla camada de células designada por bainha de *Hertwig's*. É a bainha de *Hertwig's* que define a forma, comprimento, tamanho e número da futura raiz. Esta bainha estende-se em redor da polpa dentária em formação, situando-se entre esta e o folículo dentário (Chiego, 2014; Kumar, 2011; Nanci, 2013).

A camada interna de células da bainha de *Hertwig's* é formada a partir do epitélio interno do esmalte. Na raiz, essas células induzem as células da papila dentária a diferenciarem-se em odontoblastos e formar a dentina radicular. Com a deposição de dentina, a camada

externa da bainha desintegra-se formando restos epiteliais chamados de restos epiteliais de *Malassez* (Nanci, 2013).

Com a dentina exposta, as células do folículo dentário diferenciam-se em cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos. Os cementoblastos aderem à dentina radicular exposta secretando cimento. Os osteoblastos incorporam o osso alveolar, enquanto que os fibroblastos formam as fibras de *Sharpey* do ligamento periodontal (Kumar, 2011).

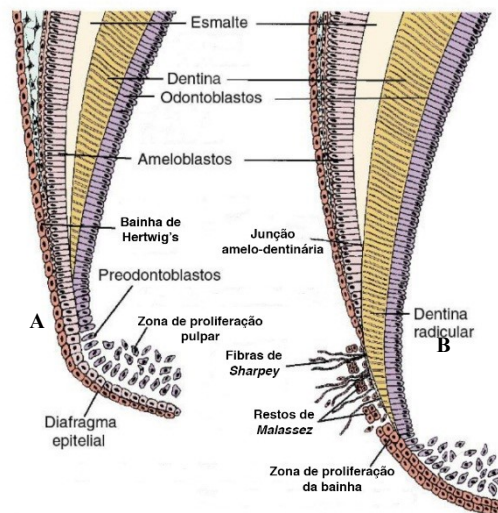


Figura 7 – Formação da raiz num estadio mais inicial (A) e mais tardio (B). Adaptado de (Chiego, 2014).

A dentinogénese mantém o processo de alongamento/crescimento da raiz até que se atinja uma abertura apical restrita entre 1 a 3 mm, para que seja possível a comunicação vascular e nervosa entre a polpa e o periodonto. É o crescimento da raiz que empurra o dente no sentido vertical, induzindo a sua erupção (Chiego, 2014).

2.2 O dente e as suas estruturas

Os dentes ocupam aproximadamente 20% da área da boca localizando-se nos alvéolos da mandíbula e da maxila. Apresentam como principal função a mastigação, no entanto, os dentes desempenham outras funções, não menos importantes, como a formação de uma barreira física que protege a cavidade oral e permitir um discurso e fonética corretos (Brand, Isselhard, & Satin, 2013; Nanci, 2013).

Anatomicamente, o dente divide-se em duas porções: a coroa e a raiz. Existe dois termos associados à coroa do dente. O primeiro é coroa anatômica que representa a estrutura do dente coberta por esmalte e o segundo termo é coroa clínica que se refere à parte do dente visível na cavidade oral. A coroa tem com funcionalidade a mastigação dos alimentos, enquanto que a raiz permite dar suporte ao dente. Como referenciado anteriormente, a coroa é coberta por esmalte ao passo que a raiz é coberta por cimento. Da união do esmalte com o cimento dá-se o nome de junção amelocementária e que se traduz numa marca visível a olho nu também chamada de linha cervical (Avery, 2002; Brand *et al.*, 2013).

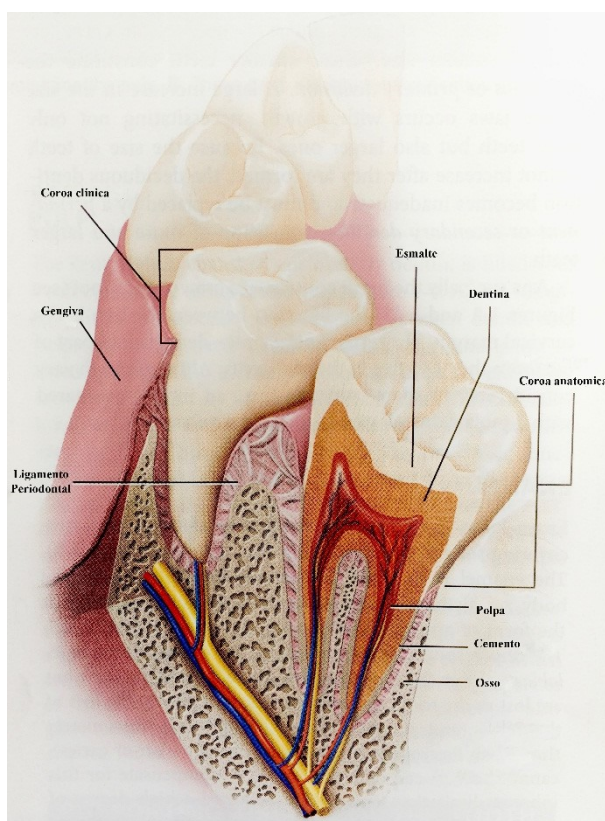


Figura 8 – O dente e as suas estruturas de suporte. Adaptado de (Chiego, 2014).

A um nível mais interno do dente podemos encontrar várias estruturas que compõem o dente propriamente dito: o esmalte, a dentina e a polpa. O esmalte é o tecido mais mineralizado do corpo humano e que por isso se traduz numa estrutura de extrema dureza. Quimicamente o esmalte consiste em aproximadamente 96% de matéria inorgânica, representada por cristais de hidroxiapatite, e 4% de matéria orgânica e água (Chiego, 2014; Nanci, 2013). O esmalte é de origem ectodérmica e forma-se por secreção de umas células chamadas ameloblastos. Estas células acabam por desaparecer quando o dente erupciona. Neste sentido considera-se que o esmalte maduro é uma estrutura acelular e por isso incapaz de se reparar ou auto-regenerar quando destruído. Para compensar esta limitação, o esmalte apresenta uma organização estrutural complexa (em forma de prismas hexagonais) e alto grau de mineralização, que lhe resistir às forças mastigatórias. Embora o esmalte seja um tecido biologicamente não vital, ele é permeável, ocorrendo trocas iónicas entre o esmalte e o meio ambiente da cavidade oral, principalmente com a saliva (Ferraris & Muñoz, 2009; Nanci, 2013).

A dentina possui origem ectomesenquimatosa e ocupa a maior área do dente. A dentina ao nível da raiz encontra-se coberta pelo cimento, enquanto que na coroa encontra-se coberta por esmalte (Berkovitz et al., 2004; Brand et al., 2013; Chiego, 2014). Na sua composição química podemos encontrar 70% de matéria inorgânica sob a forma de cristais de hidroxiapatite, 20% de matriz orgânica rica em colagénio e 10% de água. Embora a dentina seja um tecido mineralizado, ela contém mais matriz orgânica comparativamente ao esmalte, o que a torna num tecido mais resiliente e elástico, conferindo suporte e proteção ao esmalte durante a mastigação (Avery, 2002; Chiego, 2014; Nanci, 2013). A dentina consiste em inúmeros túbulos paralelos, entre si, que atravessam toda a sua extensão. Estes túbulos possuem no seu interior células alongadas que são responsáveis pela formação e manutenção da dentina – os odontoblastos. Os corpos dos odontoblastos encontram-se alinhados na região mais profunda da dentina definindo a margem externa da polpa dentária. Contrariamente ao esmalte, a dentina é um tecido sensitivo, pois apresenta terminações nervosas ao longo dos túbulos dentinários, e possui a capacidade de se reparar através da estimulação dos odontoblastos, produzindo nova dentina (Berkovitz et al., 2004; Nanci, 2013).

Segundo (Chiego, 2014), “a polpa dentária é o tecido conectivo brando e laxo localizado na porção central de cada dente”. Ao espaço ocupado pela polpa no dente dá-se o nome de cavidade pulpar, que se divide na porção coronal (ou câmara pulpar) e na porção

radicular (ou canais radiculares). Portanto, a polpa presente na coroa chama-se polpa coronária e a polpa presente na raiz chama-se polpa radicular. A polpa é um tecido conectivo especializado, bastante vascularizado e enervado, respondendo a qualquer estímulo sobre a forma de dor (Chiego, 2014; Kumar, 2011). Na região central da polpa podemos encontrar a maior concentração de veias, artérias e plexos nervosos, circunscritos numa matriz extracelular composta por fibroblastos e fibras de colagénio. Estes vasos sanguíneos e nervos entram e saem na polpa pelos canais radiculares, através de um forame apical, na extremidade da raiz. Na periferia da polpa encontramos a região odontogénica, composta pelos odontoblastos, uma zona acelular, uma zona rica em células, onde se distinguem os fibroblastos e células indiferenciadas ectomesenquimais e plexos nervosos parietais. Os odontoblastos são células diferenciadas, e em caso de lesão ou morte, eles são substituídos a partir da diferenciação das células indiferenciadas ectomesenquimais (Berkovitz *et al.*, 2004; Chiego, 2014; Kumar, 2011).

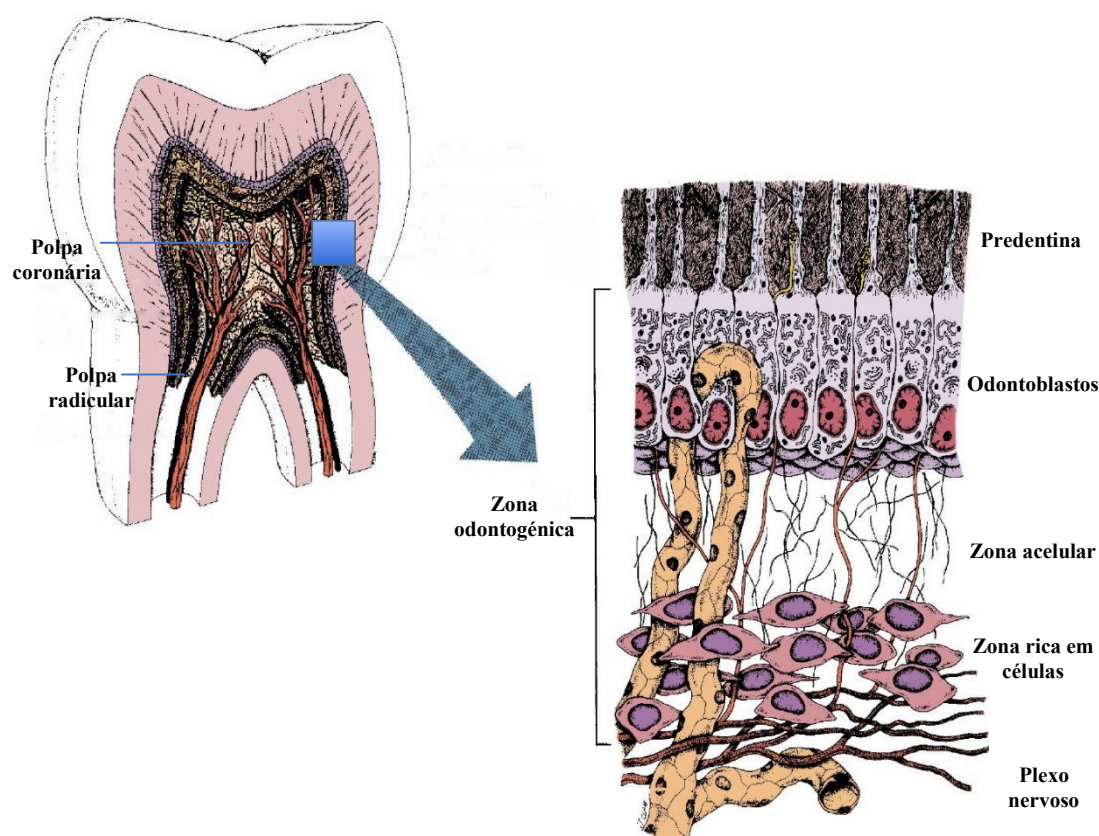


Figura 9 - Esquema do órgão pulpar que mostra a arquitetura da polpa. Adaptado de (Chiego, 2014).

A dentina e a polpa são tecidos que, quando abordados, são descritos separadamente devido às suas diferenças histológicas, no entanto, embriologicamente e funcionalmente apresentam uma íntima relação. Neste sentido a dentina e a polpa devem ser consideradas uma unidade (complexo dentina-polpa) que funciona mutuamente – a dentina protege a polpa e a polpa nutre a dentina (Kumar, 2011; Nanci, 2013). A polpa apresenta diversas funções, sendo todas igualmente importantes: indutora, porque no estadio inicial de desenvolvimento da polpa, ela interage com o epitélio da boca, promovendo a formação do dente; formativa, na medida em que produz (através dos odontoblastos) a dentina; nutritiva, pois alimenta a dentina através do transporte de oxigénio e nutrientes; protetora, em resposta a estímulos tais como, o calor, frio, pressão, técnicas operatórias incisivas e agentes químicos, promovendo a formação de dentina esclerótica (deposição de minerais nos túbulos dentinários) e assim protegendo-a da invasão de bactérias ou substâncias bacterianas; reparadora, em que é capaz de produzir nova dentina (dentina reparadora) como resposta a um estímulo nocivo externo (Chiego, 2014; Kumar, 2011).

A fixação dos dentes aos maxilares é mediada por um conjunto de tecidos a que damos o nome de periodonto. O periodonto é constituído por tecidos que sustentam e protegem o dente: osso alveolar, ligamento periodontal, cemento, e todos os quais estão protegidos pela gengiva. O funcionamento adequado do periodonto só é conseguido através da integridade estrutural e a interação entre estes vários tecidos. (Avery, 2002; Nanci, 2013). O osso alveolar é o osso que forma o alvéolo dentário – cavidade onde se insere as raízes dos dentes nos maxilares. O osso alveolar é uma estrutura odontodependente, ou seja, forma-se na presença dos dentes e desaparece com a perda ou extração dos mesmos (Ferraris & Muñoz, 2009).

O cemento é um tecido conjuntivo mineralizado, de origem ectomesenquimal, que mantém uma ligação firme com a dentina radicular, recobrindo-a. Em termos percentuais, o cemento contém 65% de matéria inorgânica, 23% de matéria orgânica e 12% de água (Berkovitz *et al.*, 2004). O cemento assemelha-se ao osso tanto a nível estrutural como nos seus constituintes orgânicos e inorgânicos, no entanto, o cemento é um tecido avascular e não apresenta inervação. Como semelhanças, a apatite é o mineral presente em ambos os tecidos e o colagénio é o componente orgânico predominante (Avery, 2002; Kumar, 2011; Nanci, 2013). As células que originam o cemento tomam o nome de cementoblastos. Os cementoblastos sintetizam a matriz colagénia que posteriormente se mineraliza. Por vezes, estes cementoblastos incorporam-se nessa matriz, ficando presos

em lacunas. A estas células aprisionadas dá-se o nome de cementócitos, que são semelhantes aos osteócitos no osso (Chiego, 2014). O cimento pode ser caracterizado em dois tipos básicos: cimento celular e cimento acelular. Como o nome indica, o cimento celular contém células (cementócitos) e o cimento acelular não. O cimento acelular encontra-se adjacente à dentina radicular, localizando-se desde a margem cervical até os dois terços da raiz. Por ser o primeiro cimento a ser formado também se atribui o nome de cimento primário. O cimento celular ou secundário, forma-se após o acelular e localiza-se mais na porção apical da raiz e na zona de furca. O cimento também pode receber uma outra classificação segundo a origem das fibras da matriz orgânica: fibras intrínsecas e fibras extrínsecas (Berkovitz et al., 2004; Nanci, 2013). Segundo (Kumar, 2011), “as fibras intrínsecas produzidas pelos cementoblastos são pequenas e geralmente são orientadas paralelamente à superfície radicular” e “as fibras extrínsecas produzidas pelos fibroblastos do ligamento periodontal são feixes grandes e geralmente orientadas perpendicularmente à superfície radicular”. Geralmente no cimento celular reside as fibras intrínsecas, ao passo que no cimento acelular encontramos principalmente as fibras extrínsecas (Berkovitz *et al.*, 2004).

A função principal do cimento é fornecer um meio de ancoragem para a ligação das fibras de colagénio do ligamento periodontal ao dente. Como segunda função ressalta a capacidade do cimento permitir uma adaptação funcional dos dentes, ou seja, a deposição continua de cimento na zona apical consegue compensar o desgaste oclusal dos dentes. Outra função não menos importante é a habilidade do cimento em reparar fracturas ou reabsorções radiculares, através da reposição de novo cimento (Kumar, 2011).

O osso alveolar e o cimento estão unidos mediante um tecido conectivo fibroso, o ligamento periodontal. As fibras de colagénio que compõem o ligamento periodontal encontram-se embutidas no cimento e no osso alveolar. Desta maneira, o ligamento periodontal assemelha-se a uma ponte que estabelece a ligação entre o dente e o osso alveolar. No forame apical, o tecido pulpar torna-se continuo com o tecido do ligamento periodontal. Esta continuidade permite explicar porque uma inflamação do tecido dentário (normalmente devido a cárie), dissemina-se para o ligamento periodontal e para os restantes tecidos do periodonto. As funções principais do ligamento periodontal são: suportar e manter os dentes nos alvéolos; permitir que os dentes resistam às forças mastigatórias; e actuar como receptor sensorial proprioceptivo, para controlar a posição dos maxilares e obter-se assim uma correta oclusão (Ferraris & Muñoz, 2009; Nanci,

2013). O ligamento periodontal apresenta uma espessura que varia entre 0,15 e 0,38mm, sendo que a porção mais delgada se encontra no terço médio da raiz. A sua espessura encontra-se relacionada com a idade, diminuindo progressivamente com o aumento da idade. Como quase todos os tecidos conjuntivos, o ligamento periodontal possui na sua constituição células, um compartimento extracelular com fibras e substância fundamental amorfa. Dentro do conjunto de células podemos encontrar células formadoras (fibroblastos, osteoblastos e cementoblastos), células de reabsorção (osteoclastos e cementoclastos), células defensivas (macrófagos, mastócitos e eosinófilos), células epiteliais de Malassez e células mesenquimais indiferenciadas (Chiego, 2014). As fibras que compõem o ligamento periodontal são maioritariamente colagénias (cerca de 90%), mas também podemos encontrar várias fibras do tipo elásticas, as elastinas, oxitalânicas e as elauninas (Nanci, 2013). As fibras de colagénio, também denominadas de fibras principais, dividem-se em dois grupos de acordo com a sua localização no dente: o grupo gengival, que se localiza em torno do colo dentário; e o grupo dento-alveolar que rodeia as raízes dos dentes (Figura 10).

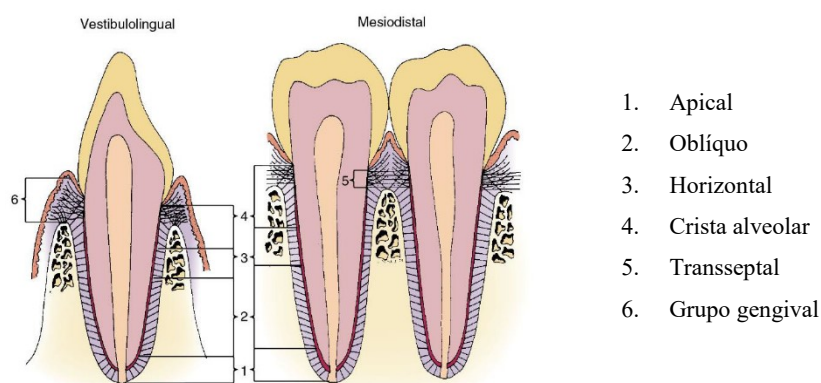


Figura 10 - Esquema representativo da localização das fibras principais. Adaptado de (Chiego, 2014).

Estas fibras principais encontram-se estrategicamente posicionadas e com inclinações diferentes para promover as suas funções. Na tabela 1 encontra-se descrito os vários tipos de fibras principais, as suas localizações e as respectivas funções (Chiego, 2014).

Fibras principais		
Grupo de fibras	Local de inserção	Função
Grupo de fibras gengivais		
Transeptais	Da região cervical de um dente à face mesial e distal dos dentes adjacentes	Resistir à separação entre os dentes
Gengivais aderida	Da crista alveolar à gengiva aderida	Resistir ao descolamento gengival
Gengivais livres	Da crista alveolar à gengiva livre	Resistir ao descolamento gengival
Circunferenciais	Em redor do colo do dente	Resistir ao descolamento gengival
Grupo de fibras dento-alveolares		
Horizontais	Porção média da raiz ao osso alveolar	Resistir a forças horizontais e de inclinação
Obíquas	Terço apical da raiz ao osso alveolar	Resistir a forças verticais e intrusivas
Apicais	Ápex da raiz ao osso alveolar	Resistir a forças verticais
Da crista alveolar	Porção cervical da raiz à crista alveolar do osso alveolar	Resistir a forças verticais e intrusivas
Interradiculares	Entre raízes de dentes multiradiculares ao osso alveolar	Resistir movimentos verticais e laterais

Tabela 1 - Resumo do local de inserção e respectivas funções das fibras principais. Adaptado de (Chiego, 2014).

Entre as várias fibras encontramos um espaço a que se dá o nome de espaço intersticial. Nesses espaços podemos observar a presença de rede de vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, que possuem a função de manter a vitalidade do ligamento periodontal. A substância fundamental do ligamento periodontal é composta por uma matriz extracelular contendo glicoproteínas, proteoglicanos, glicosaminoglicanas e maioritariamente água (cerca de 70%). Pensa-se que esta grande quantidade de água tem um efeito significativo sobre a capacidade do dente resistir a cargas de tensão durante a mastigação (Ferraris & Muñoz, 2009; Kumar, 2011).

2.3 Células Estaminais

As células estaminais representam uma população de células com propriedades que as tornam especiais. Por definição, as células estaminais são designadas como sendo células indiferenciadas que possuem duas características importantes: a capacidade de auto-renovação e a propriedade de gerar inúmeros tipos de células diferenciadas (Figura 11) (Estrela *et al.*, 2011; Otsu *et al.*, 2014; Y.-J. Park, Cha, & Park, 2016; Rimondini & Mele, 2009). Mais explicitamente, as células estaminais têm o potencial de se renovarem através de mitoses, gerando células filhas idênticas a si (auto-renovação), assim como, de originar descendentes de diferentes linhagens (células diferenciadas) (Lanza & Atala, 2013).

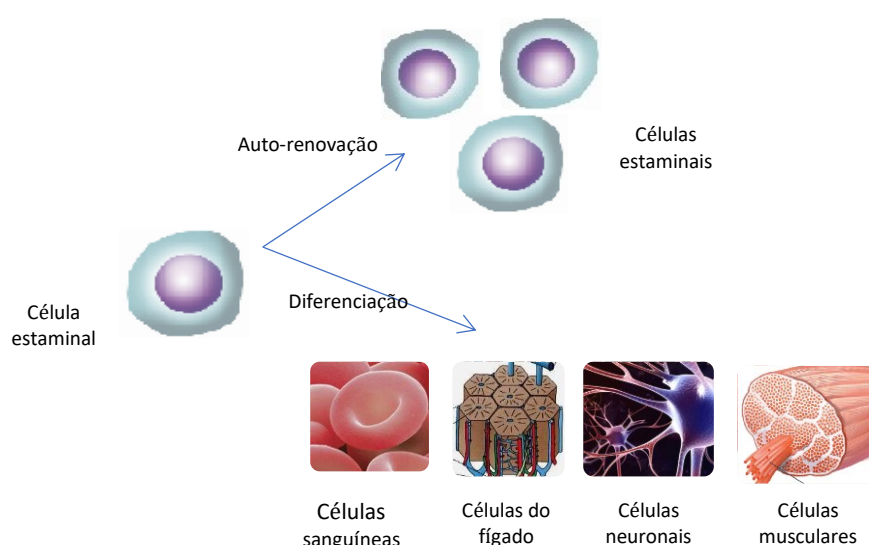


Figura 11 - Características das células estaminais. Adaptado de (Li *et al.*, 2014).

Devido a estas características particulares, as células estaminais têm sido um foco importante na medicina regenerativa, com o intuito de reparar órgãos e tecidos envelhecidos ou danificados (Estrela *et al.*, 2011; Leeb *et al.*, 2011; Otsu *et al.*, 2014; Y.-J. Park *et al.*, 2016).

De acordo com a sua origem, as células estaminais são classificadas em dois grupos: células estaminais embrionárias (ESC) e células estaminais adultas ou somáticas (ASCs). As ESC são células indiferenciadas, mas com capacidade de se diferenciar em quase todas as linhagens celulares, excepto nas linhas celulares que formam estruturas extra-embrionárias (pluripotentes), como o cordão umbilical e a placenta (Bassir *et al.*, 2016; Bossú *et al.*, 2014; Choumerianou *et al.*, 2008; Leeb *et al.*, 2011).

As ESC são derivadas da massa celular interna (Figura 12f) do blastocisto, uma estrutura embrionária que se forma poucos dias (4-5 dias) após a fertilização (Bassir *et al.*, 2016; Bossú *et al.*, 2014; Choumerianou *et al.*, 2008; Otsu *et al.*, 2014; Y.-J. Park *et al.*, 2016; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2012). O blastocisto (Figura 12e) advém de sucessivas clivagens (divisões mitóticas) a que o zigoto (oócito fecundado) é submetido durante os estádios iniciais do desenvolvimento embrionário. Este é constituído por uma camada externa de células epiteliais, chamada de trofoblasto (Figura 12g), que dará origem aos anexos embrionários, e um aglomerado de células no seu interior que tem denominação de massa celular interna (Slack, 2012).

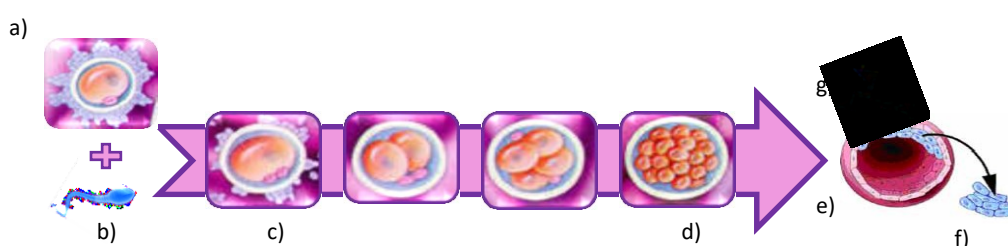


Figura 12 - Estádios iniciais do desenvolvimento embrionário. a) Óocito; b) Espermatozóide; c) Zigoto; d) Mórula; e) Blastócisto; f) Massa celular interna; g) Trofoblasto. Adaptada de <http://www.sindioses.org/sociedad/stemcell05.jpg>.

Como referenciado anteriormente, esse aglomerado de células é composto por ESC, que possuem a capacidade de gerar células das três camadas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme, e que posteriormente, originam todos os tipos de células que compõem um organismo adulto (Bassir *et al.*, 2016; Bossú *et al.*, 2014; Lanza & Atala, 2013; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2012; Slack, 2012).

Quanto às células estaminais adultas, estas são células isoladas a partir de vários tecidos/órgãos pós-natais. Estas células são também consideradas indiferenciadas e com capacidade de auto-renovação, mas que contrariamente às ESC, apresentam restrição na sua aptidão de diferenciação (Bassir *et al.*, 2016; Bossú *et al.*, 2014; Y.-J. Park *et al.*, 2016). São denominadas de multipotentes pois apenas podem-se diferenciar nas diversas células do órgão ou tecido onde residem originalmente. Estas células apresentam um papel muito importante na manutenção e reparação dos tecidos maduros onde residem (Bassir *et al.*, 2016; Y.-J. Park *et al.*, 2016; Piscaglia, 2008).

Actualmente, sabe-se que são várias as fontes onde podem ser encontradas células estaminais multipotentes, nomeadamente na placenta, sangue do cordão umbilical, medula óssea, retina, sistema nervoso central, pele, músculo, fígado, tecido adiposo,

dentes, ligamento periodontal, entre outros (Bassir *et al.*, 2016; Estrela *et al.*, 2011; Piscaglia, 2008; Shilpa *et al.*, 2013).

Consoante a sua localização as ASCs, estas são divididas em duas linhagens: células estaminais hematopoiéticas e células estaminais mesenquimais (MSCs). As células estaminais hematopoiéticas derivam da medula óssea, do sangue do cordão umbilical ou do sangue periférico, já as células estaminais mesenquimais têm como origem, por exemplo, o tecido adiposo, fígado, líquido amniótico, tecidos dentários, entre outros (Shilpa *et al.*, 2013).

Apesar de as células estaminais adultas terem limitações quer a nível de diferenciação quer de proliferação *in vitro*, comparativamente às ESC, elas apresentam determinadas vantagens que as tornam uma opção atraente para potenciais terapias regenerativas (Bassir *et al.*, 2016; Bossú *et al.*, 2014; Y.-J. Park *et al.*, 2016). As ASCs têm a vantagem da sua obtenção poder ser proveniente de tecidos do próprio paciente, prevenindo assim possíveis rejeições por parte do sistema imunológico. Por outro lado, a afluência do uso destas células deve-se ao facto de estas não acarretarem tantos aspectos legais e éticos, que limitam drasticamente o uso das ESC, pois a obtenção destas implica a destruição do embrião (Bassir *et al.*, 2016; Estrela *et al.*, 2011; Y.-J. Park *et al.*, 2016; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2012). Em contrapartida, a presença de ASCs nos tecidos maduros é relativamente escassa, e por isso o seu isolamento é um processo difícil. As ESC são aparentemente uma escolha adequada para inúmeras aplicações clínicas, devido à sua enorme plasticidade e de fácil proliferação, mesmo *in vitro*. No entanto, estas duas características marcantes podem ser um problema quando estas células são transplantadas, pois podem levar à formação de teratomas (tumor constituído por células das três linhas germinativas) (Bassir *et al.*, 2016; Choumerianou *et al.*, 2008; Otsu *et al.*, 2014; Piscaglia, 2008; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2012).

Em 2006, Takahashi and Yamanaka desenvolveram um método de criação de células com propriedades similares às das ESC, a partir de células estaminais adultas multipotentes. A estas células, geradas por um processo de reprogramação celular, atribuíram o nome de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs). Este método de conversão de células somáticas multipotentes em células pluripotentes ocorre pela introdução de quatro factores de transcrição: Oct-4, Sox2, c-Myc e Klf4 (K. Hynes *et al.*, 2015; Otsu *et al.*, 2014; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2012).

A reprogramação de iPSCs veio permitir a obtenção de células, do próprio paciente, com carácter de auto-renovação e pluripotência semelhante às ESC. Desta maneira, conseguiu-se ultrapassar a barreira ética associada ao uso de células embrionárias e evitar rejeições imunológicas após implantação de células não autólogas. Apesar destas vantagens, as iPSCs apresentam limitações ao seu uso, devido à instabilidade genómica e propensão à formação de tumores *in vivo* (K. Hynes *et al.*, 2015; Otsu *et al.*, 2014; Y.-J. Park *et al.*, 2016).

Actualmente são diversas as fontes celulares humanas utilizadas para a criação de iPSCs, nomeadamente os fibroblastos presentes na derme, os queratinócitos da pele, as células do líquido amniótico, os glóbulos CD4⁺, as células estaminais mesenquimais e mais recentemente as células da polpa dentária (Y.-J. Park *et al.*, 2016).

Desde o seu aparecimento, as iPSCs passaram a ser alvo de grande interesse por parte da medicina regenerativa. No entanto persiste a dúvida se as iPSCs são verdadeiramente iguais às ESC e a sua tendência para formar tumores faz com que a sua manipulação tenha de ser melhorada antes de se tornarem a principal ferramenta nos processos regenerativos (Otsu *et al.*, 2014; Y.-J. Park *et al.*, 2016).

2.4 Células estaminais dentárias, características e aplicabilidade na Medicina Dentária

As células mais estudadas e promissoras em inúmeras aplicações clínicas são as células estaminais mesenquimais. Inicialmente foram isoladas a partir da medula óssea, mas hoje em dia é vasto o leque de opções onde podem ser isoladas, nomeadamente nos tecidos dentários (Egusa *et al.*, 2012).

As células estaminais mesenquimais são células multipotentes e com a capacidade de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos, *in vitro*. De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), as MSCs expressam os seguintes marcadores celulares: CD105, CD73, CD90, mas não expressam marcadores de superfície das células hematopoieticas CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR. Recentemente foram descobertos mais dois marcadores de superfície específicos das MSCs, CD271 e antígeno-1 (Egusa *et al.*, 2012; Ledesma-Martinez, Mendoza-Nunez, & Santiago-Osorio, 2016; Şahin, Doğan, & Demirci, 2016).

Em 2006, a ISCT definiu as células estaminais dentárias como um tipo de células estaminais mesenquimais. Para tal, as células estaminais dentárias tiveram de possuir três critérios estipulados: expressar marcadores genéticos típicos das células mesenquimais, serem capazes de aderir às caixas de cultura e habilidade de diferenciação nas mesmas linhas celulares das MSCs (Şahin *et al.*, 2016; Yan, Yu, Zhang, Tang, & Yu, 2010).

As células estaminais dentárias surgem como uma alternativa atraente a outras fontes celulares para ensaios clínicos, uma vez que estas células são facilmente adquiridas logo desde a infância, pela esfoliação natural da dentição decídua ou através de dentes permanentes que são sujeitos a procedimentos dentários quotidianos. A sua relativa facilidade de isolamento veio assim competir com as promissoras células estaminais da medula óssea e embrionárias, mas que estas em contrapartida, acarretam problemas associados às técnicas de isolamento dolorosas e preocupações éticas, respectivamente.

Assim, a descoberta das células estaminais dentárias é uma mais valia para a medicina regenerativa pois apresenta como vantagens uma elevada acessibilidade, não causam dor nem morbidade do local dador e possuem também uma elevada taxa de proliferação e multipotência (Bossú *et al.*, 2014; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2012; Şahin *et al.*, 2016).

São vários os tipos de células estaminais mesenquimais que podem ser isoladas a partir de tecidos dentários. Entre elas temos:

- células estaminais da polpa dentária (DPSCs);

- células estaminais de dentes decíduos esfoliados (SHED);
- células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs);
- células estaminais da papila apical (SCAP);
- células precursoras do folículo dentário (DFPCs) (Bossú *et al.*, 2014; Nakahara, 2011; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2012).

Todos os tipos de células citadas a cima são provenientes das estruturas dentárias. No entanto, estas populações de células apresentam propriedades diferentes entre elas, nomeadamente nos marcadores que expressam e na capacidade de diferenciação. Estas propriedades específicas encontram-se relacionadas de acordo com o local onde as células são isoladas (Y.-J. Park *et al.*, 2016).

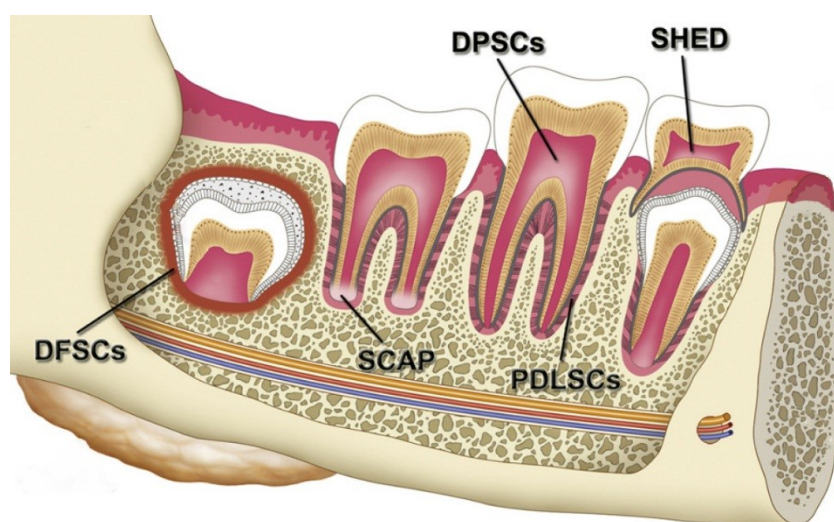


Figura 13 - Fontes de células estaminais adultas na cavidade oral. DPSCs: células estaminais da polpa dentária; SHED: células estaminais da polpa dentária de dentes decíduos esfoliados; SCAP: células estaminais da papila apical; PDLSCs: células estaminais do ligamento periodontal; DFSCs: células estaminais do folículo dentário. Adaptado de (Egusa *et al.*, 2012).

2.4.1 DPSCs

As primeiras células estaminais dentárias humanas foram isoladas e caracterizadas por Gronthos *et al.* (2000) (Bassir *et al.*, 2016; Gronthos, Mankani, Brahim, Robey, & Shi, 2000). Estas células foram primeiramente isoladas da polpa de terceiros molares inclusos e assim denominadas de células estaminais da polpa dentária (Bossú *et al.*, 2014; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2012). O nicho das DPSCs centra-se principalmente na área perivascular da câmara pulpar de qualquer dente permanente, incluindo supranumerários (Morsczeck *et al.*, 2008; Rimondini & Mele, 2009; Şahin *et al.*, 2016). As DPSCs estão

presentes em diversas espécies, tendo sido relatado o isolamento destas não só em humanos como em ratinhos, ratazanas, ovelhas, chimpanzés e porcos (La Noce *et al.*, 2014).

As células estaminais da polpa dentária demonstram possuir elevada capacidade de proliferação (auto-renovação) e de diferenciação, dependendo do meio de cultura onde são inseridas (Kim, Shin, Song, & Kim, 2015; Maxim, Soritau, Baciut, Bran, & Baciut, 2015; Nakahara, 2011). Esta capacidade de multipotência permite a diferenciação das células estaminais da polpa em variadas linhagens celulares, tais como, odontoblastos, osteoblastos, condrócitos, miócitos, células neuronais e adipócitos (Aurrekoetxea *et al.*, 2015; Inanç & Elçin, 2011; Li *et al.*, 2014).

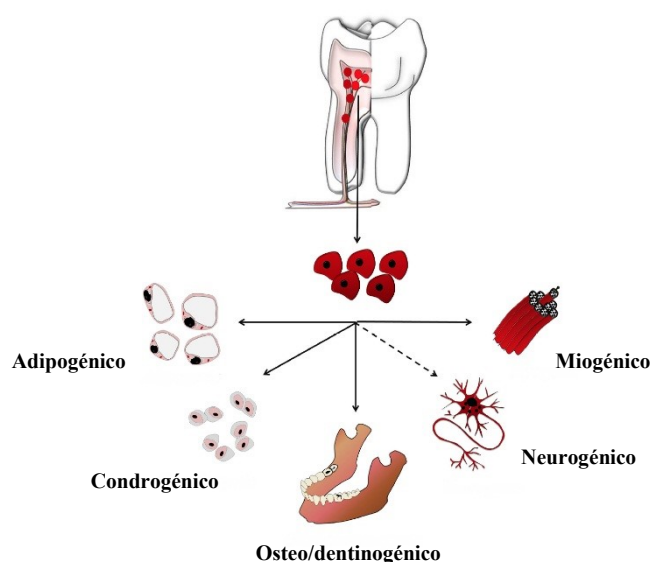


Figura 14 - Potencial de diferenciação das DPSCs *in vitro*. Adaptado de (Aurrekoetxea *et al.*, 2015).

Além das linhas celulares citadas anteriormente, alguns autores referem ainda que as DPSCs também podem-se diferenciar, *in vitro*, em melanócitos, cardiomiócitos, hepatócitos e células epiteliais da córnea (Estrela *et al.*, 2011; J. Liu *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2010). É de salientar que esta capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens celulares está dependente do microambiente onde as células residem, incluindo factores de crescimento, receptores moleculares, moléculas de sinalização, factores de transcrição e proteínas da matriz extracelular (Estrela *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2010).

As DPSC são o tipo células estaminais dentárias largamente mais estudadas, sendo muitas vezes inseridas em estudos comparativos com outras células estaminais mesenquimais, nomeadamente com as células estaminais da medula óssea (BMSCs). Apesar de as

DPSCs possuem características muito similar às BMSCs, estas apresentam 30% mais capacidade de proliferação, maior taxa de formação de colónias e maior disponibilidade. As DPSCs são originadas a partir das células da crista neural, enquanto que as BMSCs são derivadas da mesoderme. Esta diferença de origem reflete-se na maior potenciação das DPSCs em se diferenciarem em células neuronais, comparativamente às BMSCs (La Noce *et al.*, 2014; Şahin *et al.*, 2016).

Após a sua descoberta e caracterização *in vitro*, as DPSCs humanas, em conjunto com o *scaffolds* de hidroxiapatite/fosfato tricálcico (HA/TCP), foram transplantados subcutaneamente em ratinhos imunocomprometidos. Após 6 semanas observou-se a formação de uma estrutura mineralizada (tipo dentina) composta por uma matriz de colagénio altamente organizada, disposta perpendicularmente à camada de odontoblastos, e tecido fibroso contendo vasos sanguíneos com um arranjo similar ao encontrado no complexo polpa-dentina de dentes normais (Aurrekoetxea *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2015). Dois anos depois, Batouli e seus colaboradores utilizando as mesmas técnicas de isolamento, cultura e transplantação descritas por Gronthos (2000), quiseram explorar mais aprofundadamente a capacidade das DPSCs na regeneração de tecidos. Neste estudo a transplantação foi efectuada usando dentina humana como suporte (DPSCs/dentina humana). Observou-se que as DPSCs foram capazes de gerar uma estrutura de tipo dentina reparadora diretamente sobre a superfície de dentina humana. Contrariamente aos resultados obtidos por Gronthos, a transplantação deste estudo não foi capaz de formar uma dentina nova organizada em túbulos. Talvez a justificação resida sobre as diferenças na composição química e estrutura tridimensional do HA/TCP. Ainda assim, estes resultados mostram a possibilidade das DPSCs poderem vir a ser usadas em terapias para reparação dentária (Batouli, Miura, & Brahim J, 2003; Tatullo, Marrelli, Shakesheff, & White, 2015).

As proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) encontram-se relacionadas com o desenvolvimento do dente, verificando-se a sua expressão aumentada durante a diferenciação de odontoblastos. Como prova dessa relação está o estudo de Iohara em 2004, onde extraíram e isolaram a DPSCs de incisivos superiores de cães e em seguida cultivadas concomitantemente com BMP2. Foi realizada a exposição cirúrgica do dente canino e a sua subsequente amputação. Posteriormente, as DPSCs/BMP2 foram cultivadas no canal radicular amputado e a cavidade foi preenchida com ionómero de vidro e compósito. Após 4 semanas a transplantação, verificou-se que a cultura de DPSCs

com BMP2 diferenciou-se em odontoblastos capazes de formar dentina reparadora no canal radicular amputado (Kim *et al.*, 2015).

O melhor modelo animal para investigação dentária é o cão devido a semelhanças anatômicas, ao padrão de crescimento e fisiopatologias idênticas ao dos humanos. No entanto, é difícil transplantar uma mistura de DPSCs e *scaffolds* em dentes de animais. Por este motivo, a maior parte dos estudos científicos é realizado nos tecidos subcutâneos de ratinhos (Kim *et al.*, 2015).

(Nör, 2006) isolou DPSCs e algumas SHED, cultivando-as no *scaffolds* de poli (L-ácido láctico) (PLLA). Células endoteliais microvasculares dérmicas humanas foram inseridas na cultura das células estaminais. Todo este conjunto de células estaminais e células endoteliais foram de seguida transplantadas no tecido subcutâneo de ratinhos imunocomprometidos. Após 14 dias observaram a formação de polpa dentária com características morfológicas similares à de um tecido pulpar normal (Figura 15) (Şahin *et al.*, 2016).

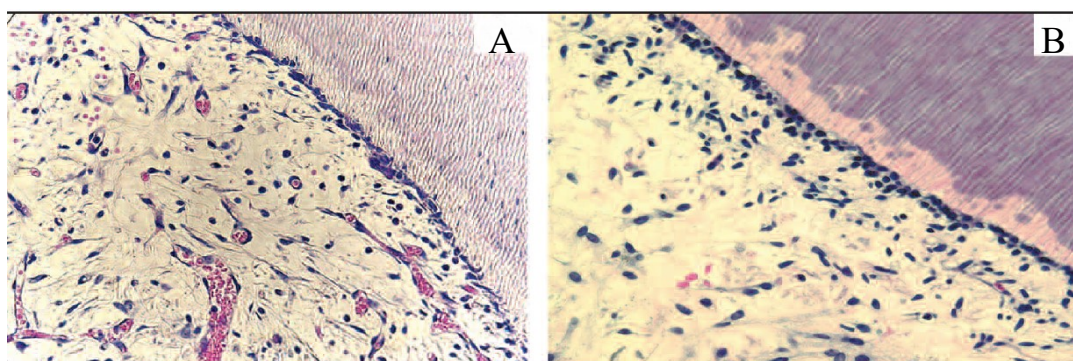


Figura 15 - Histologia da polpa dentária. (A) Avaliação histológica da formação de polpa dentária, após a transplantação de DPSCs e células endoteliais microvasculares dérmicas, num ratinho imunocomprometido. (B) Histologia da polpa dentária normal (controlo). Adaptado de (Nör, 2006).

(Papaccio *et al.*, 2006) desafiaram as DPSCs e osteoblastos diferenciados destas, a mostrarem a sua capacidade para proliferarem, diferenciarem-se e produzirem osso, *in vitro*, após criopreservação de longo tempo. Após 2 anos de criopreservação, os osteoblastos derivados das DPSC foram capazes de reiniciar rapidamente a sua proliferação e produzir tecido ósseo, mostrando-se vital quando transplantados para um rato imunodeprimido, sendo remodelado em osso lamelar. Além disso, as DPSCs mostraram possuir altas taxas de proliferação e mantiveram a sua capacidade de diferenciação semelhante ao de células não criopreservadas. Os resultados observados foram bastante positivos e de extrema relevância para a medicina regenerativa, visto

permitir a utilização destas células em terapêuticas a longo prazo, após a sua colheita, sem que se perca a qualidade desta (Peng, Ye, & Zhou, 2009).

Huang e a sua equipa, em 2010, quiseram demonstrar pela primeira vez que é possível regenerar *de novo* o complexo pulpo-dentinário, usando um fragmento da raiz de um dente, com o canal vazio. Neste estudo isolaram DPSCs e SCAP de dentes humanos e BMSCs de ossos longos, também de humanos. Numa primeira fase, os investigadores quiseram comparar a capacidade de diferenciação *in vitro* destes três tipos celulares. Para isso, cada uma destas linhas celulares foram cultivadas, em caixas de petri, em três diferentes meios de diferenciação: odonto/osteogénico, adipogénico e neurogénico (George T-J Huang *et al.*, 2010).

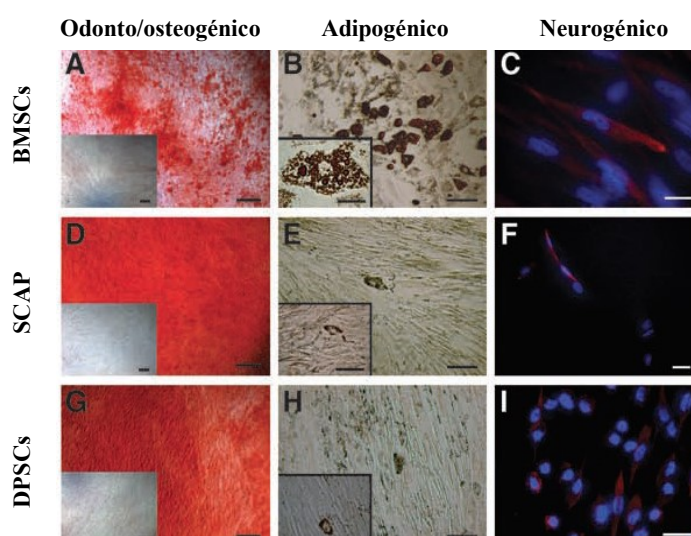


Figura 16 - Propriedades de diferenciação das linhagens DPSCs e SCAP em comparação com BMSCs. (A,D,G) Indução odonto/osteogénico. (B,E,H) Indução adipogénica. (C,F,I) Indução neurogénica. Adaptado de (George T-J Huang *et al.*, 2010).

De acordo com a figura 16, pode-se observar uma coloração mais avermelhada nas culturas de DPSCs e SCAP em comparação com a cultura de BMSCs, o que significa que existe maior produção de matriz mineralizada com as células estaminais dentárias. Por outro lado, as BMSCs ganham no que toca à diferenciação em adipócitos, comparativamente às DPSCs e SCAP. Quanto à diferenciação neurogénica encontra-se presente nas três culturas celulares com cerca de 20-30% das células a expressar o marcador neurogénico bII-tubulina.

Na segunda fase deste estudo, Huang quis demonstrar a capacidade regenerativa das células DPSCs e SCAP em formar, *in vivo*, o complexo pulpo-dentinário. Foram extraídos dentes humanos e seccionados horizontalmente na porção radicular para obterem

fragmentos de 6-7 mm de comprimento. O canal radicular foi alargado em 2,5mm de diâmetro e selado em uma das extremidades com cimento de mineral trióxido agregado (MTA). Posteriormente, a cultura celular de DPSCs ou de SCAP, previamente embutida no *scaffolds* poli (D,L-láctico-co-glicólico) (PLG), foi inserida dentro do canal de cada fragmento radicular e este de seguida transplantado num rato imunocomprometido (Figura 17) (George T-J Huang *et al.*, 2010; Şahin *et al.*, 2016).

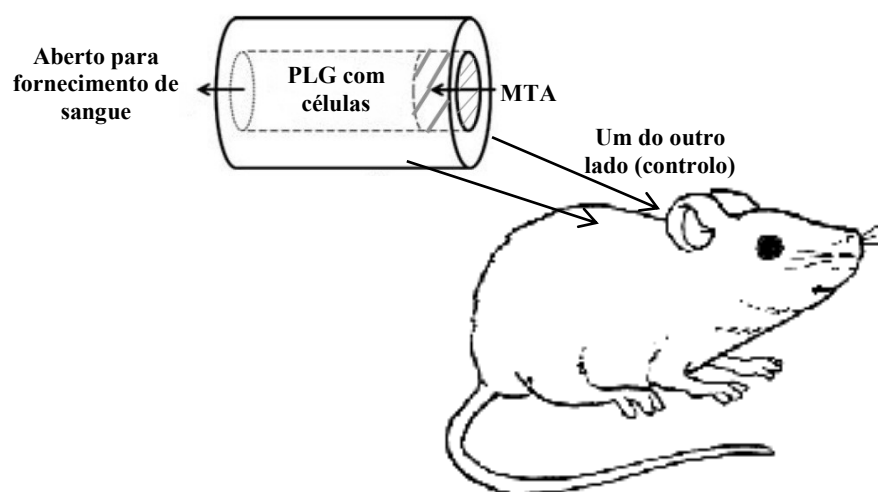


Figura 17 - Representação esquemática do modelo animal e do fragmento radicular transplantado para regeneração da polpa/dentina. Adaptado de (George T-J Huang *et al.*, 2010).

Após 3 meses da transplantação, os fragmentos foram removidos e sujeitos a análise histológica. No fragmento controlo, o canal vazio foi preenchido apenas por tecido adiposo (Figura 18), enquanto que os canais preenchidos com DPSCs/PLG ou SCAP/PLG foram preenchidos com tecido pulpar, vascularizado e com uma densidade celular uniforme, semelhante ao da polpa natural (Figuras 19 e 20) (George T-J Huang *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2015).

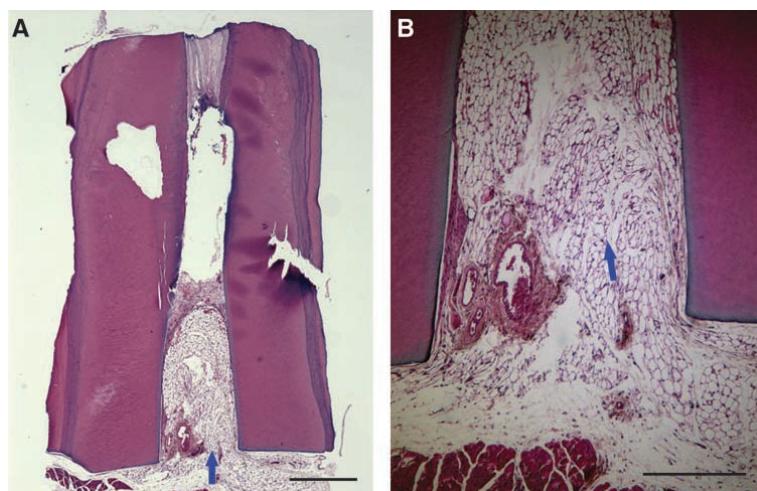


Figura 18 - Análise histológica do grupo de controlo. A seta azul indica o tecido adiposo a introduzir-se no canal radicular através da sua abertura. (A) menor ampliação. (B) maior ampliação. Adaptado de (George T-J Huang *et al.*, 2010).

Além disso, observou-se a formação de uma camada contínua de dentina depositada nas paredes dentárias do canal. Esta estrutura tipo dentina parece ter sido produzida por odontoblastos recém-formados. No entanto verificou-se pouca organização e desalinhamento destes odontoblastos. Só em poucos sítios é que se verificou este alinhamento típico de odontoblastos normais (Figuras 19E, 19F e 20G). Também foi escasso observar a dentina com estrutura em túbulos (Figura 20G) (George T-J Huang *et al.*, 2010).

Com o intuito de verificar se as células responsáveis pela regeneração do complexo pulpo-dentinário dentro do canal eram de origem humana, utilizaram-se anticorpos de mitocôndria humana. Os resultados confirmaram que a grande maioria das células responsáveis pela regeneração observada eram de origem humana (George T-J Huang *et al.*, 2010).

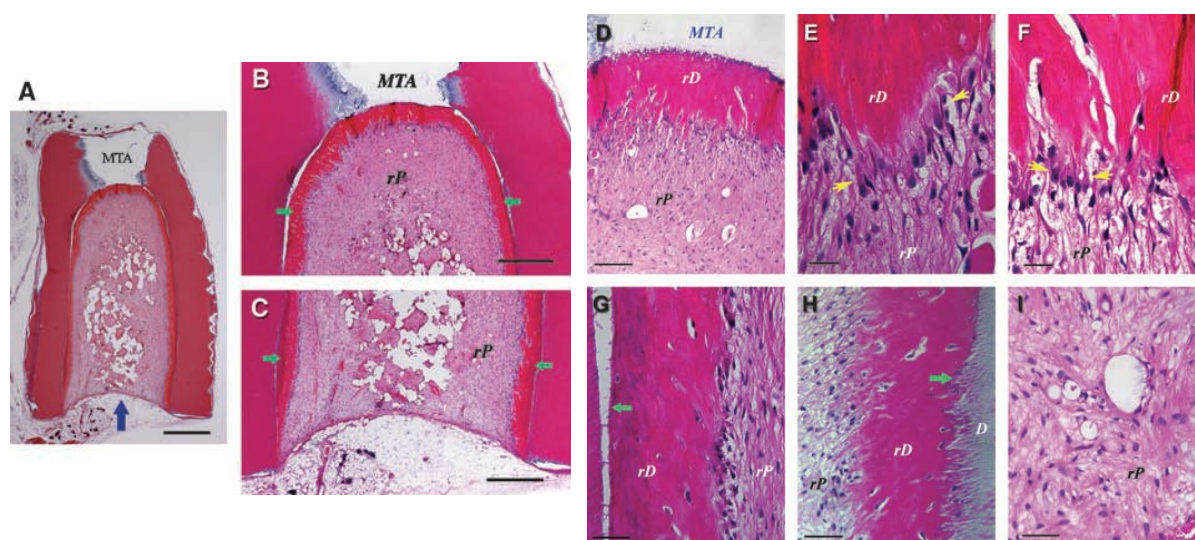


Figura 19 - Análise histológica da regeneração de dentina/polpa *in vivo* usando SCAP. Legenda: *D* - dentina de origem; *rD* - dentina regenerada, *rP* - polpa regenerada. As setas azuis em (A) indicam a entrada do fornecimento sanguíneo; as setas verdes em (B) e (C) indicam a camada contínua de espessura uniforme de *rD*; as setas amarelas em (E) e (F) indicam a região de odontoblastos bem alinhadas com corpos celulares polarizados; e as setas verdes em (G e H) indicam junções entre *D* e *rD*. Adaptado de (George T-J Huang *et al.*, 2010).

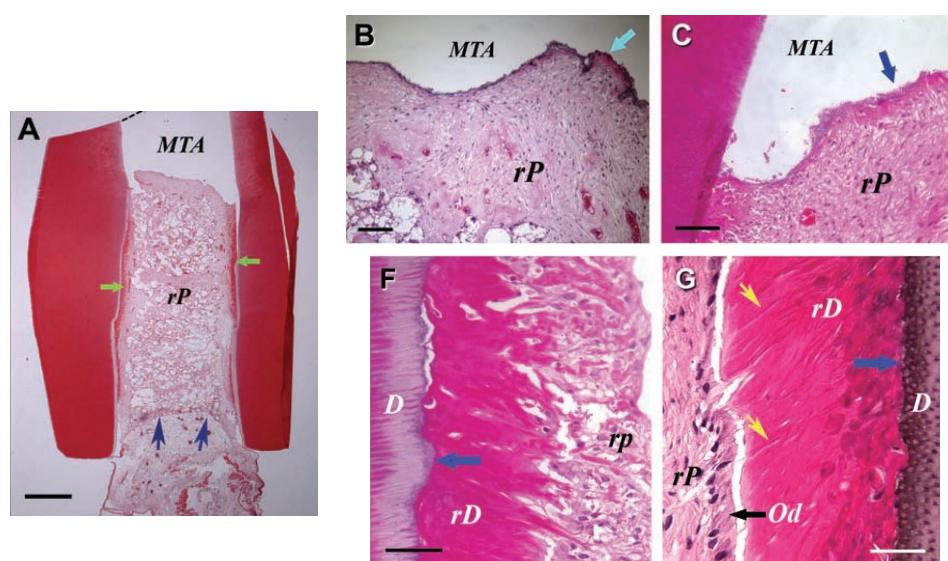


Figura 20 - Análise histológica da regeneração de dentina/polpa *in vivo* usando DPSC. Legenda: *D* - dentina de origem, *rD* - dentina regenerada, *rP* - polpa regenerada, *Od* - odontoblastos. As setas verdes em (A) indicam a *rD*; as setas azuis em (A) indicam a entrada do fornecimento sanguíneo; as setas azuis em (B) e (C) indicam uma fina camada de *rD* por baixo do cimento de MTA; as setas azuis em (F) e (G) indicam a junção de *D* com *rD*; a seta preta em (G) indica os odontoblastos alinhados; e as setas amarelas em (G) indicam os túbulos dentinários. Adaptado de (George T-J Huang *et al.*, 2010).

As células que expressam o marcador CD105⁺ parecem ter um papel importante na angiogénese e neogénese. Neste sentido (Iohara *et al.*, 2011) quiseram verificar o potencial regenerativo destas células com e sem a adição do factor 1 derivado de células

estromais (SDF-1). O SDF-1 é um quimiotático implicado no recrutamento de MSCs para um local de lesão que necessite de reparação tecidual. Para isso, isolaram DPSCs/CD105⁺ de dentes de cães e transplantaram-nas num *scaffolds* de colagénio TE, juntamente com SDF-1, para um modelo canino com pulpectomia. Como controlo isolaram células adiposas também de cães que expressavam o marcador CD105⁺ (Tatullo *et al.*, 2015). Após 14 dias estes autores demonstraram sucesso na regeneração do complexo pulpo-dentinário, incluindo nervos e vascularização, quando transplantado com DPSCs/CD105⁺ em conjunto com SDF-1, enquanto que o transplante de células CD105⁺ sozinhas ou SDF-1 sozinho produziram polpa mas em menores quantidades (Kim *et al.*, 2015). Embora o isolamento de células contendo o imunofenótipo CD105⁺ tenha aumentado a regeneração da polpa e dentina, desconhece-se a real necessidade de seleção celular, uma vez que as MSCs de polpa não seleccionadas (células da polpa total) também foram capazes de regenerar os tecidos, embora em muito menor extensão em comparação com células da polpa expressando CD105⁺. O mesmo constatou-se no transplante de células adiposas CD105⁺ e SDF-1, mostrando uma drástica redução na regeneração do tecido pulpar, indicando a existência de diferenças inerentes entre MSCs de diferentes origens teciduais. A análise estatística mostrou que a área regenerada foi significativamente maior quando as células da polpa CD105⁺ foram transplantadas com SDF-1 em comparação com células da polpa CD105⁺ sozinhas, SDF-1 sozinho ou com células adiposas CD105⁺ com SDF-1 (Figura 21) (Cao *et al.*, 2015; Iohara *et al.*, 2011).

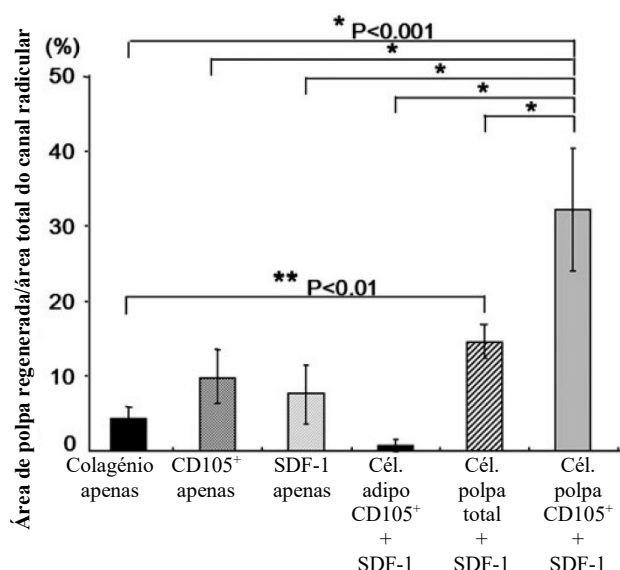


Figura 21 - Relação da área regenerada com a área do canal radicular no dia 14. Adaptado de (Iohara *et al.*, 2011).

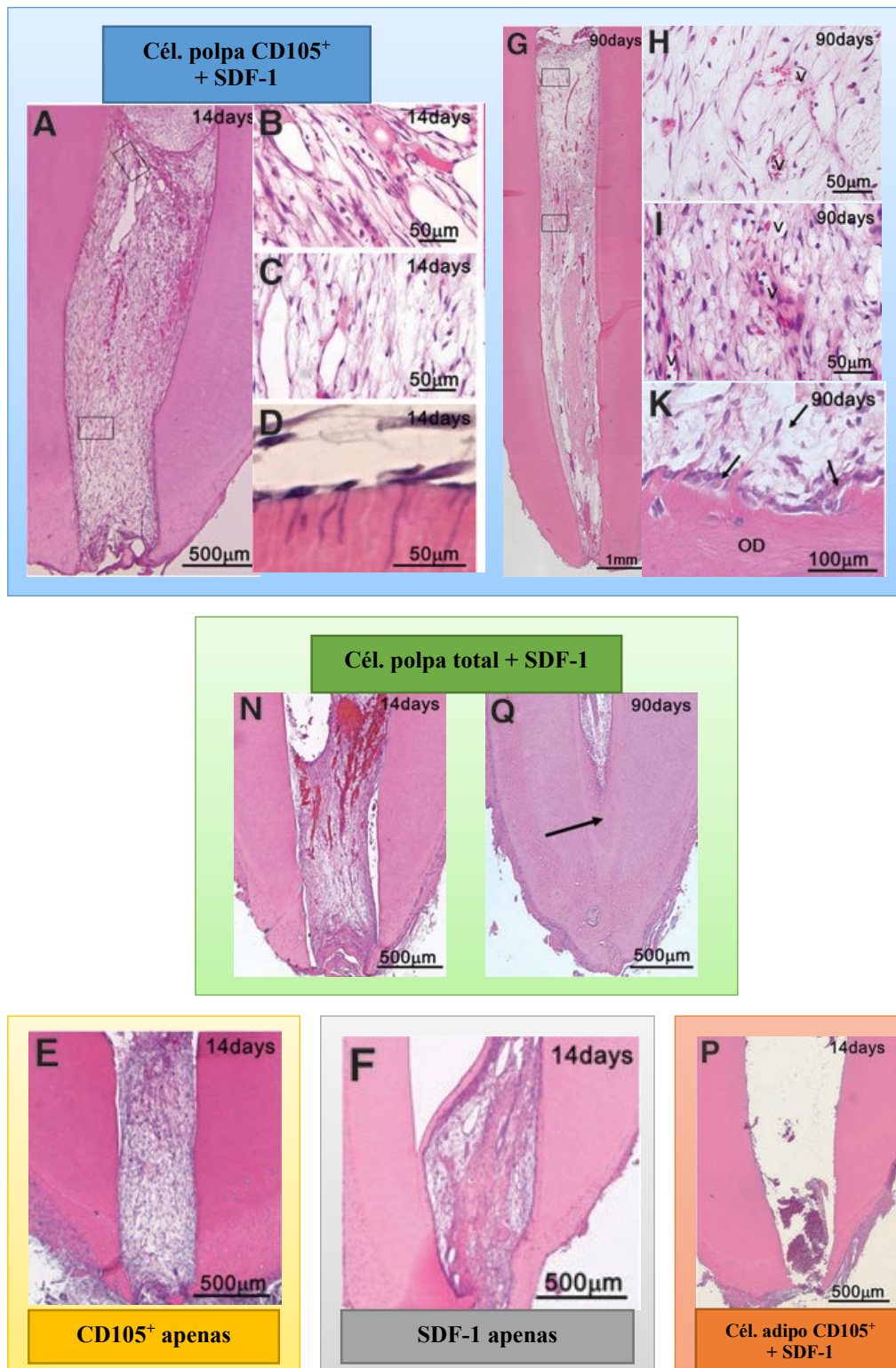


Figura 22 - Regeneração do tecido pulpar no canal radicular vazio após pulpectomia em cães. Legenda: (A-D) 14 dias após transplantação de células da polpa CD105⁺ com SDF-1; (E) células da polpa apenas; (F) SDF-1 apenas; (G-I) e (K) 90 dias após a transplantação de células da polpa CD105⁺ com SDF-1; (H, I) formação novos vasos sanguíneos; (K) odontoblastos (setas) recobrimo a osteodentina recém-formada (OD); (N) e (Q) células da polpa total após 14 e 90 dias da transplantação, respectivamente; (P) células adiposas CD105⁺ com SDF-1. Adaptado de (Iohara *et al.*, 2011).

Um exemplo de estudo que recorre ao uso de porquinhos como modelo animal é o de (Kodonas, Gogos, Papadimitriou, Kouzi-Koliakou, & Tziafas, 2012), onde extraíram incisivos permanentes e pré-molares não erupcionados de porquinhos com 7 meses de idade. Destes dentes foram isoladas DPSCs e posteriormente criopreservadas em azoto líquido. Um ano depois foram extraídos novos dentes incisivos permanentes, a partir dos quais foram fragmentados na parte média da raiz e removido o tecido pulpar. Nos canais radiculares desses fragmentos foram cultivadas as DPSCs criopreservadas, impregnadas num *scaffold* de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). Posteriormente todo este conjunto foi implantado na mandíbula dos porquinhos, no local das recentes extrações dentárias. Após 6 e 10 semanas os fragmentos foram recolhidos e analisados histologicamente, onde revelaram a formação de matriz orgânica de pré-dentina tubular, depositada nas paredes do canal, por células polarizadas juntas a essa matriz (Kim *et al.*, 2015; Tatullo *et al.*, 2015).

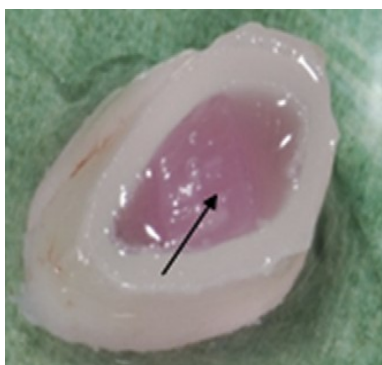


Figura 24 - Fragmento modelo de canal radicular. Os canais radiculares foram preenchidos com *scaffold* de PLGA contendo DPSCs de suíno. Adaptado de (Kodonas *et al.*, 2012).

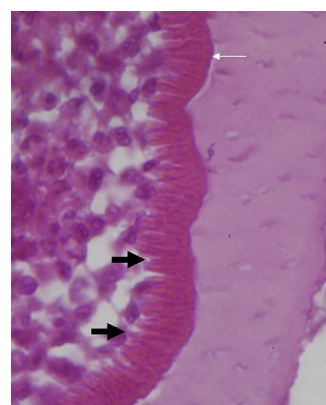


Figura 23 - Fragmento de raiz contendo DPSCs 10 semanas pós-operatório. Observa-se a matriz orgânica recém-formada depositada nas paredes do canal (seta branca) adjacente a uma camada contínua de células polarizadas mostrando a sua morfologia típica em forma de colunas ou de fuso (setas pretas). Adaptado de (Kodonas *et al.*, 2012).

Os *scaffolds* são elementos essenciais na Engenharia de Tecidos e têm tido destaque em estudos de regeneração da polpa. Muitos são os tipos de *scaffolds* que têm sido usados com sucesso para este fim, nomeadamente *scaffold* de colagénio, PLGA, PGA, PLLA, entre outros. No entanto, a maioria destes materiais são sintetizados e dispendiosos. Neste sentido, (Y. Wang, Zhao, Jia, Yang, & Ge, 2013) quiseram estudar a hipótese de regeneração da polpa dentária de dentes imaturos utilizando DPSCs de origem canina e *scaffold* Gelfoam, uma gelatina absorvível. Neste estudo foram extraídas DPSCs de

primeiros molares de cães (cDPSC) e DPSCs de terceiros molares humanos (hDPSC), para estudos comparativos e caracterização das cDPSC. *In vitro* as cDPSC apresentaram uma frequência de formação de colônias e capacidade proliferativa superior às hDPSC. Além disso, ainda *in vitro*, as cDPSC demonstraram expressar marcadores típicos das MSCs, bem como a capacidade de se diferenciarem em múltiplas linhas celulares. Quando transplantadas num ratinho imunocomprometido, as cDPSC em conjunto com hidroxiapatite, geraram dentina composta por uma matriz colagénia altamente ordenada, depositada perpendicularmente à camada de odontoblastos. Verificou-se também que os odontoblastos possuíam os seus prolongamentos citoplasmáticos dentro da matriz dentinária que interage com o tecido pulpar infiltrado por vasos sanguíneos (Y. Wang et al., 2013).

Incisivos superiores de cães, com ápex aberto, formaram o modelo deste estudo. Estes dentes foram submetidos a pulpectomia e posterior transplantação com cDPSC cultivadas em Gelfoam. Seguiu-se o selamento ao nível da zona cervical com MTA e restauração a resina por cima deste. Estes dentes foram monitorizados clinicamente e radiograficamente, até 24 semanas após o transplante.

Grupo (nºdentes)	Avaliação clínica				Avaliação radiográfica		
	Mobilidade dentária	Gengiva (fístula e inchaço)	Retenção da restauração		Desenvolvimento completo da raiz	Espessamento das paredes da raiz	Fechamento do foramen
Grupo 1 (n=6)	Não	Não	Boa		6	6	6
Grupo 2 (n=6)	Não	Não	Boa		4	0	0
Grupo 3 (n=6)	Não	Não	Boa		0	0	0

Tabela 2 - Avaliação clínica e radiográfica dos 3 grupos, 24 semanas após transplantação. Grupo 1 (cDPSC/Gelfoam), Grupo 2 (Gelfoam) e grupo 3 (cDPSC). Adaptado de (Y. Wang *et al.*, 2013).

Os exames clínicos (Tabela 2) mostram que nenhum dos grupos desenvolveu mobilidade dentária nem presença de fistulas. Falhas na restauração também não foram observadas em nenhum dos 3 grupos. Numa análise radiográfica destaca-se o completo desenvolvimento da raiz de todos os dentes pertencentes ao grupo 1 (cDPSC/Gelfoam), ao passo que no grupo 2 (Gelfoam) apenas 4 dentes atingiram esse total desenvolvimento da raiz e no grupo 3 (cDPSC) nenhum dente. Também em todos os dentes do grupo 1 é que se observou aumento de espessamento das paredes da raiz e fechamento do foramen,

contrariamente aos outros grupos que não possuíram nenhum dente a atingir estas características (Y. Wang *et al.*, 2013).

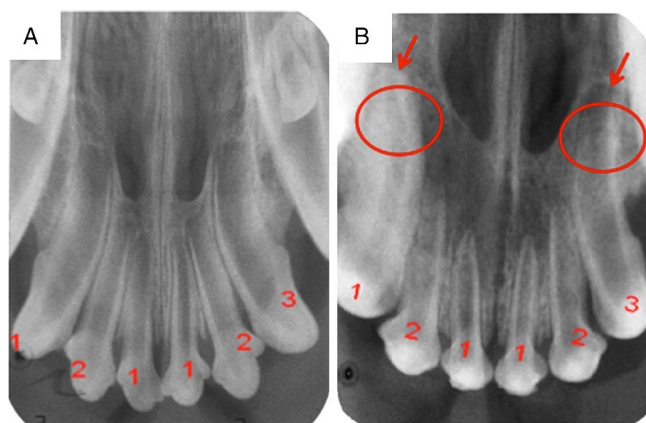


Figura 25 - Radiografias pré-operatórias e pós-operatórias. (A) mostram os incisivos superiores imaturos de cães com 18 semanas de vida, com foramen apical aberto e paredes dentinárias finas; (B) 24 semanas após a operação, o desenvolvimento das raízes foi completo no grupo 1, o forame apical foi encerrado e a parede da dentinária mais espessada. O mesmo não foi observado nos grupos 2 e 3. Adaptado de (Y. Wang *et al.*, 2013).

Grupo (nºdentes)	Pré-transplantação				24 semanas após a transplantação		
	RL	FW	WT		RL	FW	WT
Grupo 1 (n=6)	15.3±0.09	1.51±0.09	1.0±0.07		18.7±0.27	0.30±0.07	3.0±0.35
Grupo 2 (n=6)	15.4±0.09	1.48±0.08	0.95±0.07		15.6±0.22	1.10±0.07	1.0±0.07
Grupo 3 (n=6)	15.3±0.09	1.55±0.07	1.05±0.06		15.5±0.23	1.45±0.07	1.08±0.09

Tabela 3 - Análise estatística dos 3 grupos, antes e após 24 semanas a transplantação. Grupo 1 (cDPSC/Gelfoam), Grupo 2 (Gelfoam) e grupo 3 (cDPSC). RL, comprimento da raiz; FW, largura do forame; WT, a espessura da parede. Adaptado de (Y. Wang *et al.*, 2013).

Os resultados da análise estatística (Tabela 3) mostraram que antes da operação não havia diferenças significativas entre os três grupos ao nível do comprimento da raiz, largura do foramen e espessura da parede radicular. 24 semanas após o transplante, apenas no grupo contendo cDPSC/Gelfoam é que verificou resultados estatisticamente significativos. Os dentes do grupo 1 aumentaram o comprimento da raiz, o foramen reduziu a sua largura e as paredes da raiz espessaram. Os outros dois grupos praticamente não verificaram alterações em nenhum dos parâmetros avaliados (Y. Wang *et al.*, 2013).

Numa avaliação histológica, o grupo cDPSC/Gelfoam revelou a capacidade de formação de nova dentina depositada ao longo da parede interna da raiz e ainda que o tecido pulpar

recém-formado possuía no seu interior vasos sanguíneos (Figuras 26A e B). Tecido fibroso formou-se no grupo contendo apenas Gelfoam, ao passo que não se formaram estruturas histológicas óbvias no grupo contendo apenas cDPSC (Figuras 26C e D) (Y. Wang *et al.*, 2013).

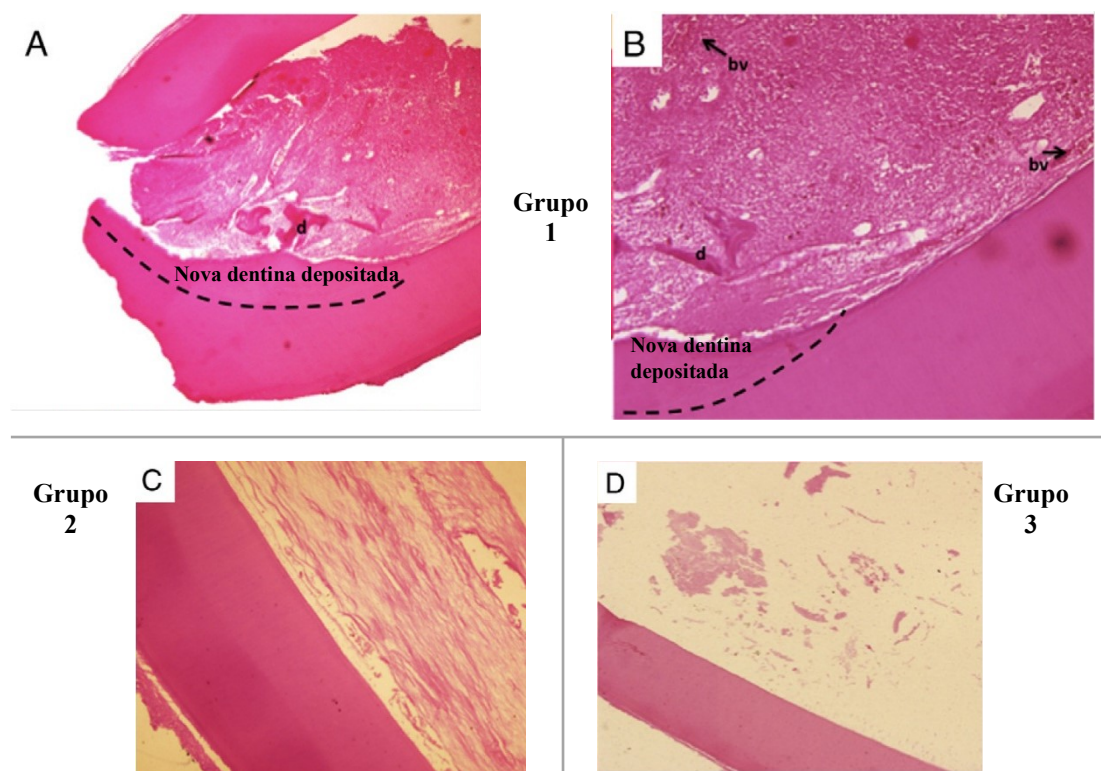


Figura 26 - Avaliação histológica da regeneração do tecido pulpar. (A e B) Grupo 1. Observa-se nova dentina depositada ao longo da parede radicular interna (d) e tecido pulpar regenerado contendo vasos sanguíneos (bv); (C) Grupo 2. Mostra a formação de tecido fibroso dentro do canal radicular; (D) Grupo 3. Não se observa formação de tecidos histológicos concretos. Adaptado de (Y. Wang *et al.*, 2013).

Embora todos estes estudos até aqui apresentados evidenciem claramente o potencial marcante das DPSCs em induzir a formação do complexo pulpo-dentinário, as suas capacidades regenerativas na cavidade oral não são restritas apenas a esse complexo.

Inúmeras referências bibliográficas evidenciam que a diferenciação osteogénica das DPSCs é um processo relativamente simples de se obter *in vitro*. Assim, nos últimos anos vários estudos têm recaído sobre a utilidade das DPSCs para a regeneração óssea *in vivo*, porém a maioria dos estudos que avaliam a aplicação das DPSCs *in vivo* são praticados em modelos animais (Aurrekoetxea *et al.*, 2015; Morad, Kheiri, & Khojasteh, 2013). Como exceção, temos um estudo clínico, em que 7 pacientes foram submetidos à extração dos seus dois terceiros molares mandibulares impactados similarmente. Desses

dentes foi feita a recolha das DPSCs e de seguida impregnadas num *scaffold* de colagénio, formando um biocomplexo. Este biocomplexo foi utilizado para preencher o local de lesão subsequente da extração do terceiro molar inferior direito (lado teste) e o alvéolo do lado esquerdo foi preenchido apenas com um *scaffold* de colagénio (lado controlo). Este estudo teve como objectivo testar a capacidade regeneradora das DPSCs e avaliar a qualidade do osso formado, até 3 anos após o excerto (D'Aquino et al., 2009; Giuliani et al., 2013).

Após a cirurgia, todos os pacientes realizaram vários *follow-up* até o 3º ano, onde foram submetidos a exames clínicos e radiográficos. Clinicamente não se observaram alterações significativas em toda a cavidade oral, nem infecção nos locais intervencionados. A função mastigatória manteve-se também normalizada.

Numa abordagem radiográfica, 6 meses após a cirurgia, verificaram alguma regeneração vertical, especialmente no lado de teste. Após 1 ano da intervenção, a regeneração óssea manteve-se mais acentuada e com menor exposição das raízes do 2º molar, no lado onde foi implementado o biocomplexo, comparativamente com o lado controlo. Passados 3 anos, os locais teste foram completamente regenerados e apresentaram melhor altura vertical do osso em relação aos locais controlo (Giuliani et al., 2013).

Após estas observações radiográficas, todos os pacientes foram submetidos a uma pequena cirurgia, a fim de se obter pequenas amostras do osso regenerado tanto do lado teste como do lado controlo, com o objectivo de efectuarem uma análise histológica (n=6) e análise por holotomografia baseada em radiação síncontron (SR-HT) (n=1). Os resultados destas análises concluíram que o osso mandibular regenerado com as DPSCs era uniformemente vascularizado e qualitativamente do tipo compacto, enquanto que as biópsias do lado controlo apresentaram osso do tipo esponjoso. A possível razão para este acontecimento deva-se ao facto de as DPSCs enxertadas não serem influenciadas pela sinalização local do osso esponjoso circundante. Embora o osso regenerado não seja igual ao fisiológico, este achado pode ter aspectos clínicos favoráveis se pensar-se que numa reabilitação com implantes, uma mandíbula mais firme permite uma melhor estabilidade dos implantes e adicionalmente melhorar a resistência a agentes mecânicos, físicos, químicos e farmacológicos (Giuliani et al., 2013; La Noce et al., 2014).

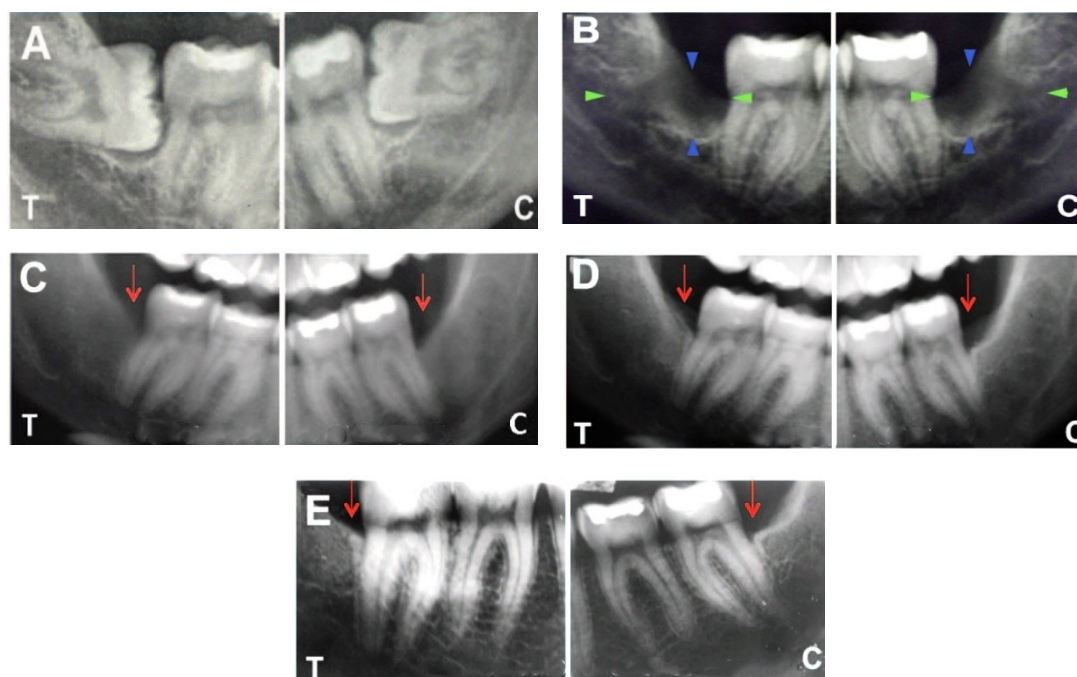


Figura 27 - Radiografias representativas dos locais de teste (T) e controle (C) de um paciente, antes e após a cirurgia. (A) antes da cirurgia; (B) imediatamente após a cirurgia; (C) 6 meses após a cirurgia, (D) 12 meses após a cirurgia; (E) 3 anos após a cirurgia. Adaptado de (Giuliani et al., 2013).

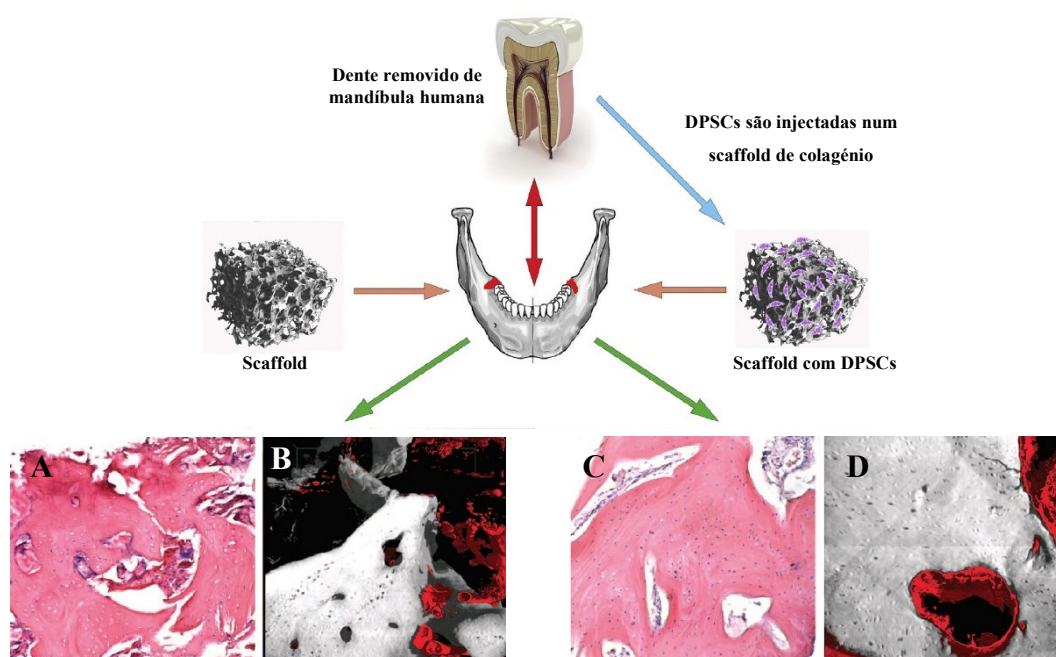


Figura 28 - Esquema representativo da metodologia usada e os resultados obtidos 3 anos após os enxertos. (A) e (B) Avaliação histológica e reconstrução 3D de SR-HT, respectivamente, mostrando osso esponjoso no local de controle. (C) e (D) Avaliação histológica e reconstrução 3D de SR-HT, respectivamente, mostrando osso compacto do lado teste. Adaptado de (Giuliani et al., 2013; La Noce et al., 2014).

2.4.2 SHED

Miura e os seus colaboradores, em 2003, isolaram as primeiras células estaminais da polpa dentária de dentes decíduos esfoliados. Como tal, a sua fonte é bastante acessível visto que os dentes decíduos humanos são rotineiramente substituídos na infância com pouca ou nenhuma morbidade para a criança (Bossú *et al.*, 2014; Ledesma-Martinez *et al.*, 2016).

Apesar de as SHED e as DPSCs serem ambas isoladas da polpa, exibem diferenças significativas quanto à sua capacidade proliferativa e expressão génica, refletindo-se no seu potencial de diferenciação. As SHED possuem uma expressão mais acentuada do marcador CD105 e CD145, o que sugere maior capacidade de diferenciação. São vários os estudos que relatam a capacidade das SHED em diferenciarem-se em osteoblastos, odontoblastos, adipócitos e células neuronais, *in vitro* (Y.-J. Park *et al.*, 2016; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2012; Sedgley & Botero, 2012). Outros autores ainda referem que as SHED conseguem-se diferenciar em condócitos, miócitos e células endoteliais (Bossú *et al.*, 2014; J. Liu *et al.*, 2015).

Segundo o estudo de (Miura *et al.*, 2003), onde caracteriza as SHED humanas, esta população de células apresenta-se como possuindo uma maior taxa de proliferação e uma duplicação celular mais rápida, comparativamente às DPSCs e às BMSCs. Morfologicamente estas células adquirem uma forma esférica de agregados celulares quando submetidos a meio de cultura de diferenciação neuronal (Maxim *et al.*, 2015; Otsu *et al.*, 2014). Nos resultados deste estudo as SHED mostraram eficácia em diferenciarem-se em odontoblastos, tanto *in vitro*, como quando transplantadas em ratinhos imunocomprometidos, originando uma estrutura típica de dentina (Figura 30A). No entanto, estas células apresentaram-se ineficazes em formar completamente o complexo pulpo-dentinário, como as DPSCs *in vivo* (Bassir *et al.*, 2016; Rimondini & Mele, 2009; Şahin *et al.*, 2016). Surpreendentemente neste estudo, as SHED não foram capazes de se diferenciar diretamente em osteoblastos (Figura 30B), mas induziram a formação de novo tecido ósseo através do seu elevado potencial osteoindutor, recrutando células osteogénicas do hospedeiro (Figura 30C). Assim as SHED são distintamente diferentes das DPSCs relativamente à diferenciação odontogénica e indução osteogénica (J. Liu *et al.*, 2015; Miura *et al.*, 2003).

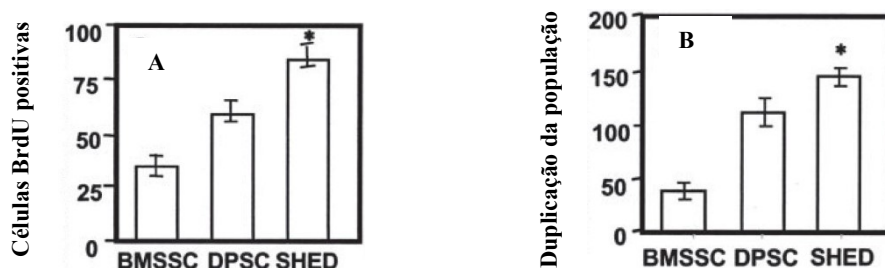


Figura 29 - Caracterização das SHED. (A) As taxas de proliferação de SHED, BMSCs e DPSCs foram avaliadas por incorporação de BrdUrd (BrdU) durante 12 h. SHED mostrou uma taxa de proliferação significativamente maior em comparação com BMSCs e DPSCs; (B) SHED foram capazes de proliferar para 140 duplicações de população, o que foi significativamente maior do que as BMSCs e DPSCs.

Adaptado de (Miura *et al.*, 2003).

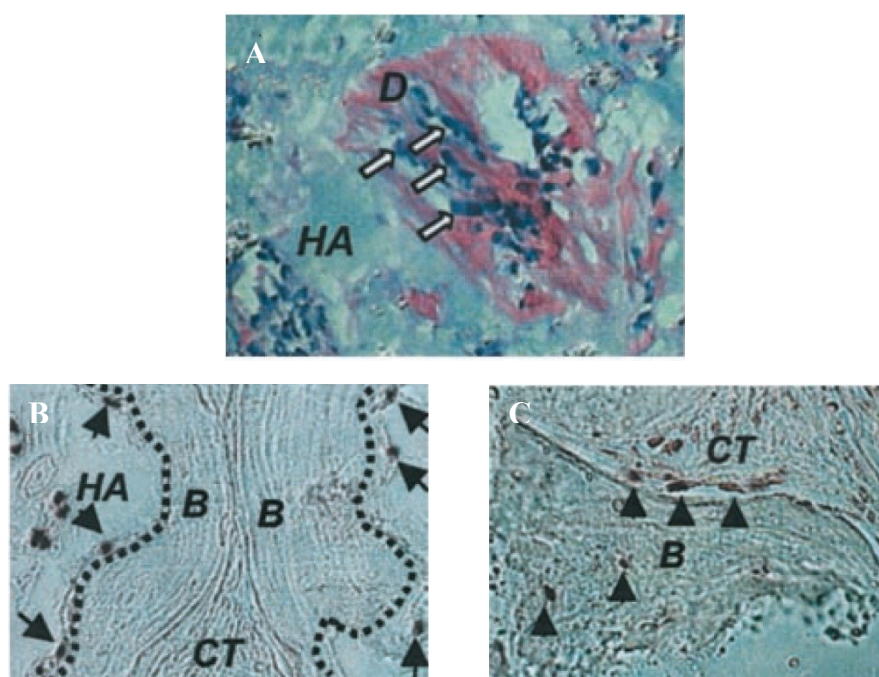


Figura 30 - SHED transplantadas num ratinho imunocomprometido. (A) Após 8 semanas de transplante, as SHED foram capazes de se diferenciar em odontoblastos (setas) sendo responsáveis pela formação da estrutura dentinária (D) nas superfícies de HA/TCP; (B) A hibridização *in situ* mostrou células humanas (setas) ligadas às superfícies de HA/TCP (HA) no local inicial de formação óssea (B). As linhas tracejadas pretas representam a interface entre o osso recém-formados e HA/TCP; (C) Os estudos de hibridização *in situ* mostraram a marcação de ADN pfl específico de ratinho, reagindo com osteoblastos e osteócitos (setas) associados à nova formação óssea (B). Adaptado de (Miura *et al.*, 2003).

Após a descoberta das SHED por parte de Miura *et al.* (2003) outros investigadores quiseram apurar mais o conhecimento sobre as verdadeiras potencialidades destas células. Em 2008, Cordeiro *et al.*, propôs-se a avaliar as características morfológicas do tecido formado quando as SHED, introduzidas em *scaffolds* biodegradáveis, são cultivadas em fatias de dentes humanos e posteriormente transplantadas em ratinhos imunocomprometidos. Para este estudo foi necessário extrair terceiros molares de

pacientes entre os 15 e os 22 anos. A estes dentes foi efectuada excisões transversais na região cervical com o intuito de se obter fatias de aproximadamente 1mm de espessura. O tecido pulpar foi removido, mas preservando-se a camada de pré-dentina. A cavidade pulpar das diversas fatias de dentes foram preenchidas com PLLA e subsequentemente divididas em três grupos: (1) SHED sozinhas; (2) SHED + Células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (HDMEC); (3) apenas o *scaffold* (controlo). As fatias de dentes/*scaffolds* contendo as SHED foram implantadas bilateralmente em ratinhos imunocomprometidos (Figura 31) (Cordeiro *et al.*, 2008).

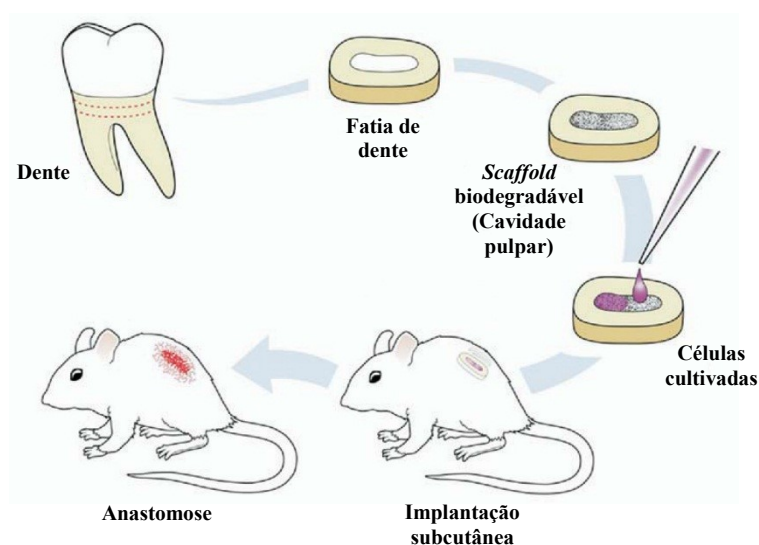


Figura 31 - Diagrama esquemático da estratégia para engenharia do tecido pulpar. Adaptado de (Cordeiro *et al.*, 2008).

Após 14 dias, as fatias do dente foram removidas e submetidas a análise histológica e imunohistoquímica. Observou-se que as SHED foram capazes de se diferenciar em odontoblastos, posicionando-se junto da pré-dentina. Esta diferenciação foi comprovada pela expressão do marcador típico da diferenciação odontogénica, o DSP. Notavelmente, as células odontoblásticas do grupo 2 apresentaram uma imunoreactividade mais acentuada de DSP do que o grupo 1 que só continha as SHED.

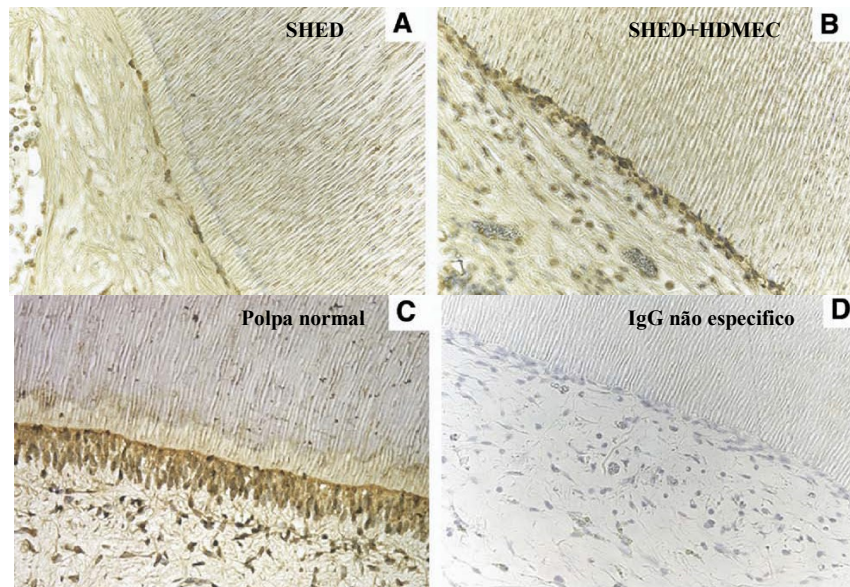


Figura 32 - Diferenciação das SHED em odontoblastos após o transplante. (A) Polpa dentária gerada apenas com SHED imunizada com anticorpo anti-DSP humano; (B) Polpa dentária gerada com SHED + HDMEC; (C) Polpa dentária de um dente extraído por razões ortodônticas, servindo como controle positivo; (D) Polpa dentária gerada com SHED + HDMEC imunizada com uma imunoglobulina inespecífica, servindo como controle negativo. Adaptado de (Cordeiro *et al.*, 2008).

Através da análise imunohistoquímica, com o anticorpo Factor VIII humano, observou-se uma maior rede microvascular no grupo 1 e 2 comparativamente ao grupo 3. No entanto a co-implantação de SHED com HDMEC não resultou num aumento significativo da rede microvascular, quando comparado com as SHED sozinhas. Por outro lado, essa co-implantação resulta na formação de tecido pulpar melhor organizado e com maior celularidade do que as SHED sozinhas. Estes resultados sugerem que a co-implantação de HDMEC leva a uma rápida organização da rede microvascular e por isso mais rápido afluxo de oxigênio e nutrientes para as SHED, melhorando a sua sobrevivência após o transplante (Bakopoulou & About, 2016; Cordeiro *et al.*, 2008).

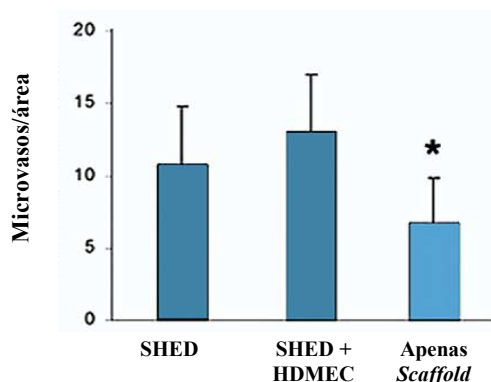


Figura 33 - Gráfico representativo do número total de microvasos, em fatias de dentes/*scaffolds* cultivadas com células SHED sozinhas, SHED + HDMEC ou com *scaffolds* vazios. Adaptado de (Cordeiro *et al.*, 2008).

Neste estudo foi possível ainda observar, pela transdução de culturas de SHED com o gene LacZ, uma expressão positiva para LacZ em células adjacentes à pré-dentina e também inúmeros vasos sanguíneos funcionais revestidos com células LacZ-positivas. É de destacar que a grande maioria dos vasos sanguíneos coraram positivamente para LacZ e continham células sanguíneas em seu lúmen. Esta observação revela que as SHED são capazes de se diferenciar em vasos sanguíneos e anastomosarem com a vasculatura do tecido hospedeiro (Bossú *et al.*, 2014; Cordeiro *et al.*, 2008).

Rosa *et al.* (2013) quis colocar as SHED à prova no que respeita à regeneração do tecido pulpar. Desta vez quiseram testar a capacidade das SHED em regenerarem a polpa em canais radiculares em todo o seu comprimento, em vez de ser apenas uma fatia como realizado no estudo anterior. Por outro lado, estes autores testaram o uso de *scaffolds* injetáveis, pois acreditam que estes serão estritamente necessários para futuras aplicações clínicas (Bossú *et al.*, 2014).

Primeiramente foram realizados estudos *in vitro* para avaliar o potencial de diferenciação das SHED em odontoblastos nas condições experimentais propostas. Para tal, cultivaram SHED em *scaffolds* de Puramatrix™ ou de colagénio tipo I humano recombinante (*rhCollagen type I*) e posteriormente injetaram a cultura em canais radiculares completos de pré-molares humanos. As SHED sobreviveram em ambos *scaffolds* e começaram a expressar marcadores de diferenciação odontoblástica (DSPP, DMP-1, MEPE) após 7 dias quando misturadas com Puramatrix™ e ao dia 14 com *rhCollagen type I*. É de salientar que as amostras controlo contendo apenas as SHED ou as SHED em cultura com os *scaffolds*, não se verificou a expressão de marcadores de diferenciação odontoblástica, o que indica que os factores morfogénicos derivados da dentina são cruciais para a diferenciação em odontoblastos (Rosa, Zhang, Grande, & Nör, 2013).

Numa segunda fase as raízes dos pré-molares humanos injetados com os mesmos *scaffolds* e as SHED foram implantadas subcutaneamente em ratinhos imunocomprometidos. Como resultados observou-se que as SHED, em ambos os *scaffolds*, diferenciaram-se em odontoblastos produzindo nova dentina tubular ao longo de todo o canal radicular. Além disso foi comparável que o tecido pulpar formado apresentava celularidade e vascularização semelhantes ao da polpa dentária humana usada como controlo. Contudo a polpa gerada apresenta ter uma matriz extracelular menos densa quando comparada com a polpa controlo. Estes resultados sugerem que as

SHED pode vir a constituir uma óptima fonte de células para a regeneração da polpa (Rosa *et al.*, 2013).

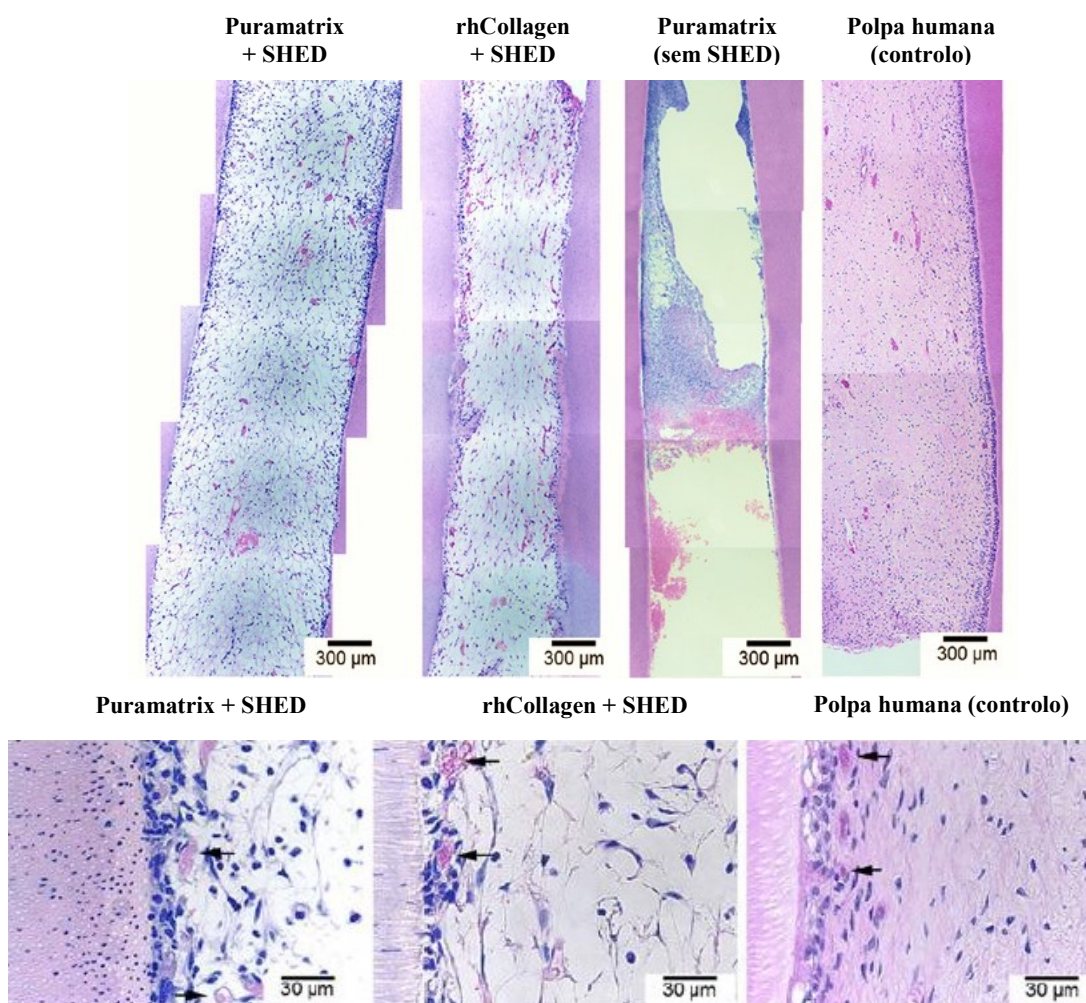


Figura 34 - Engenharia do tecido pulpar dentário com SHED injetadas em canais radiculares humanos e transplantadas em ratos imunocomprometidos. As setas pretas indicam vasos sanguíneos. Adaptado de (Rosa *et al.*, 2013).

2.4.3 PDLSCs

Em 2004, foram isoladas as primeiras células estaminais do ligamento periodontal (Bassir *et al.*, 2016). Estas células foram isoladas e caracterizadas pela primeira vez por Seo e seus colaboradores, através da extração de terceiros molares humanos impactados e subsequente remoção do ligamento periodontal aderido à superfície da raiz. *In vitro*, as PDLSCs expressam similarmente às BMSCs e DPSCs dois marcadores das células estaminais mesenquimais, o STRO-1 e CD146, no entanto estas células apresentam uma singularidade que as distingue. Elas expressão elevados níveis de *scleraxis*, um factor de transcrição específico das células de tendão, em comparação com as DPSCs e BMSC.

Esta descoberta veio apoiar a ideia de que estas células são promissoras na regeneração periodontal, visto que o ligamento periodontal é semelhante a um tendão no que respeita à sua constituição em fibras de colagénio densas e à capacidade de absorção do stress mecânico (K. Hynes *et al.*, 2015; B.-M. Seo *et al.*, 2004).

Segundo o mesmo estudo as PDLSCs mostraram possuir, *in vitro*, um crescimento celular mais elevado comparativamente às BMSCs e a capacidade de se diferenciarem em cementoblastos, osteoblastos, adipocitos e em células formadoras de colagénio. Quando transplantadas subcutaneamente em ratinhos imunocomprometidos, as PDLSCs formam uma estrutura típica ao cemento/LPD, onde se observa fibras densas de colagénio tipo I que comunicam com a nova e fina camada de cemento, semelhando-se assim às fibras de Sharpey do LPD (Bassir *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2015; B.-M. Seo *et al.*, 2004).

Este estudo realizado por Seo *et al.* (2004) representou um marco para todos os seguintes estudos que investigam o potencial destas células para a terapia periodontal regenerativa. Seguiu-se em 2008 um estudo que propôs a criação cirúrgica de defeitos periodontais em porquinhos, com o intuito de testar a capacidade regenerativa de PDLSCs autólogas dos suínos. Os defeitos periodontais experimentais foram criados pela remoção cirúrgica de osso alveolar, na região mesial de primeiros molares superiores e inferiores e posteriormente efectuado sutura em redor da porção cervical dos dentes em questão. Após um mês foram definidos três grupos: (a) grupo controlo, não tratado; (b) grupo transplantado com *scaffolds* HA/TCP; e (c) grupo transplantado com PDLSCs autólogas em combinação com HA/TCP.

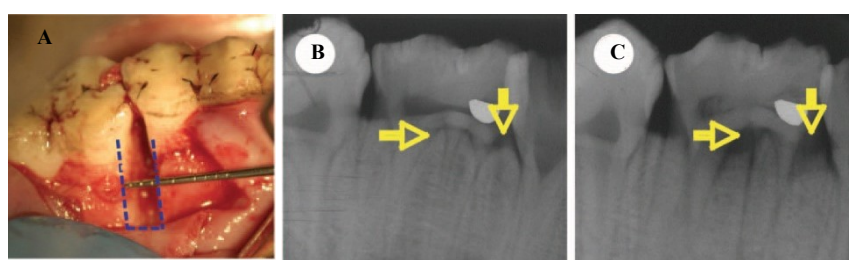


Figura 35 - Ilustração do modelo experimental de defeito periodontal. A: Foi criado um defeito ósseo de 3 mm de largura, 7 mm de comprimento e 5 mm de profundidade na região mesial dos primeiros molares maxilares ou mandibulares; B e C: Os raios x mostram que a densidade do osso alveolar diminuiu nas regiões de furca e no lado mesial do primeiro molar permanente (setas em C) em relação à densidade de controle (setas em B). Adaptado de (Y. Liu *et al.*, 2008).

12 semanas após a transplantação, os investigadores observaram que o grupo transplantado com as PDLSCs apresentavam melhoras significativas na regeneração do tecido periodontal em comparação com os outros dois grupos (Figuras 36A-C). Através

da tomografia computadorizada constataram que a altura do osso alveolar no grupo transplantado com PDLSCs recuperou aproximadamente até aos níveis normais (Figuras 36D e 36E). Em contraste, o grupo HA/TCP e o grupo de controlo mostraram uma regeneração óssea muito limitada ou até mesmo nula (Figuras 36F-I) (Bassir *et al.*, 2016; Y. Liu *et al.*, 2008).

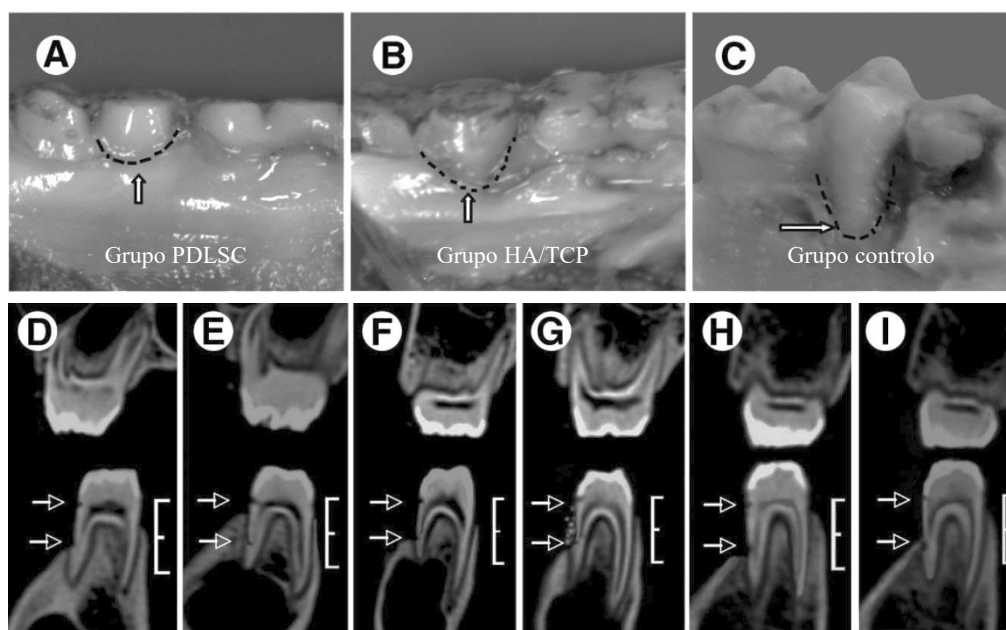


Figura 36 - Avaliação da regeneração periodontal. A-C: Visão clínica após 12 semanas da transplantação; D-I: Tomografia computadorizada dos diferentes grupos antes da transplantação (D, F e H) e 12 semanas depois do transplante (E, G e I). Como podemos observar o grupo de suínos transplantado com as PDLSCs apresentam uma regeneração periodontal quase completa, contrariamente ao grupo transplantado apenas com HA/TCP e o grupo controlo (não tratado). Adaptado de (Y. Liu *et al.*, 2008).

Em 2011, Park Young *et al.* propôs a realização de um estudo com o objectivo de comparar o potencial regenerativo das PDLSCs, DPSCs e DFPCs, e perceber qual destas populações de células estaminais dentárias é a mais indicada para futuras aplicações clínicas no campo da regeneração periodontal. Para tal, procederam à realização cirúrgica de defeitos periodontais de forma circunferencial, com 3 mm de largura, em torno da raiz mesial de pré-molares de cães da raça Beagle. 4 semanas após as cirurgias, cada Beagle foi transplantado com os três tipos de células estaminais de acordo com o esquema da figura 37.

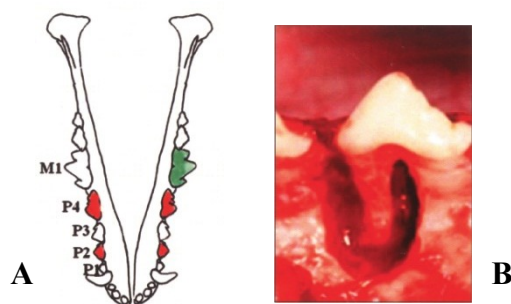


Figura 37 - Criação do modelo de periodontite em Beagles. A: Ilustração esquemática dos grupos de dentes controle (verde) e experimentais (vermelho) na mandíbula canina. Um dos primeiros molares mandibulares foi o dente de controle positivo (não manipulado) e outro o controle negativo (sem enxerto). Três dos quatro pré-molares foram enxertados com células estaminais dentárias; B: Defeito periodontal criado cirurgicamente em torno da raiz mesial de pré-molares mandibulares. Adaptado de (J.-Y. Park, Jeon, & Choung, 2011).

8 semanas depois, através da análise histológica e micro-CT observaram que nos defeitos periodontais onde foram transplantadas as PDLSCs e DFPCs promoveu-se a formação tanto de cemento, osso alveolar e ligamento periodontal. No entanto reportaram que as PDLSCs apresentaram melhores resultados em relação à qualidade e à quantidade do tecido regenerado. Além disso, neste estudo destaca-se a fraca ou quase nula regeneração periodontal por parte das DPSCs. Portanto, a evidência atual, embora ainda um pouco limitada, indica que as DPSCs não são as células estaminais ideais para a regeneração periodontal (Bassir et al., 2016; J.-Y. Park et al., 2011).

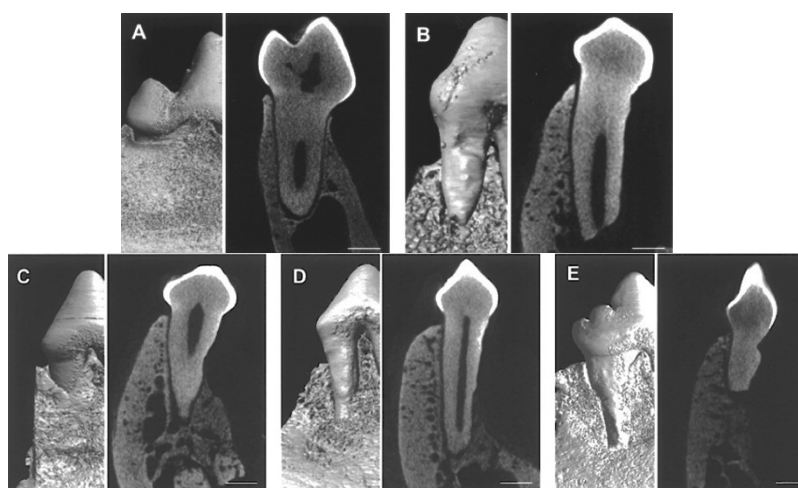


Figura 38 - Imagens micro-CT dos resultados obtidos 8 semanas após a transplantação. A: grupo controle positivo (dente normal); B: grupo controle negativo (dente com defeito periodontal criado cirurgicamente, mas sem a transplantação de células estaminais dentárias); Observou-se nova formação óssea nos grupos de transplantes de PDLSCs (C) e DFPCs (D). O defeito do grupo DPSC (E) permaneceu quase o mesmo que o defeito observado no grupo controle negativo (B). Adaptado de (J.-Y. Park *et al.*, 2011).

A capacidade de criopreservar as células estaminais é um elemento criterioso para uma abordagem clínica válida a longo prazo. Embora as PDLSCs autólogas tenham vindo a demonstrar resultados promissores em estudos pré-clínicos, o seu isolamento é limitado e implica a extracção dentária. Deste modo, dois estudos começaram a investigar hipóteses de criopreservar as PDLSCs humanas e testar, após 1 mês e após 6 meses, a viabilidade das mesmas. Esses estudos revelaram que a criopreservação das PDLSCs não afecta as suas características de células estaminais e que *in vivo* mantêm a capacidade regenerativa, sugerindo uma mais valia para terapias de regeneração do tecido periodontal (Bassir *et al.*, 2016).

2.4.4 SCAP

A papila apical é o tecido mole encontrado nos ápices das raízes dos dentes em desenvolvimento. Como este tecido está apenas presente durante a formação das raízes, antes da erupção dos dentes na cavidade oral, o isolamento das SCAP é limitado temporalmente (Kim Hynes, Menicanin, Gronthos, & Bartold, 2012; Maxim *et al.*, 2015; Morsczeck *et al.*, 2008).

As primeiras SCAP foram isoladas e caracterizadas em 2006 por Sonoyama *et al.* a partir de raízes imaturas de terceiros molares humanos inclusos (Bossú *et al.*, 2014; Jain & Bansal, 2015; J. Liu *et al.*, 2015). Em tempos pensou-se que as SCAP poderiam ser as mesmas células que as DPSCs, devido às suas inúmeras semelhanças na expressão de marcadores genéticos e capacidade de diferenciação. No entanto essa ideia foi descartada com o estudo comparativo realizado por Sonoyama *et al.* (2006). Neste estudo relataram que as SCAP exibem uma maior taxa de proliferação que as DPSCs, muito devido à maior expressão de survivina (inibidor da apoptose por inactividade das caspases) e maior actividade da enzima telomerase. Apesar da grande similaridade de marcadores de superfície entre as células estaminais dentárias, CD24 surge como um marcador específico das SCAP (Bakopoulou & About, 2016; Kim Hynes *et al.*, 2012).

Igualmente às DPSCs, as SCAP podem sofrer uma diferenciação odontoblástica, osteogénica, adipogénica e neurogénica, quando cultivadas em condições *in vitro* apropriadas (Saito, Silvério, Casati, Sallum, & Nociti, 2015; Sedgley & Botero, 2012; Ulmer, Winkel, Kohorst, & Stiesch, 2010). *In vivo*, as SCAP quando transplantadas em ratinhos imunocomprometidos possuem a capacidade de gerar dentina sobre o *scaffold* HA/TCP. Na sequência deste estudo foi elaborada outra investigação onde criaram uma

bio-raiz de HA/TCP e SCAP, revestida por Gelfoam contendo PDLSCs. Foi extraído um incisivo inferior de um porquinho e nessa cavidade alveolar foi transplantada a bio-raiz. Após 4 meses demonstraram que a junção destas células estaminais gerou um complexo raiz/periodonto capaz de suportar uma coroa de porcelana e restabelecer a função normal do dente (Bakopoulou & About, 2016; J. Liu *et al.*, 2015; Saito *et al.*, 2015; Sedgley & Botero, 2012).

Apesar das semelhanças das SCAP com as DPSCs, as SCAP advêm de uma fonte distinta e apresentam-se como células estaminais mais potencializadas na regeneração de dentina que as DPSCs. Pensa-se que essa capacidade deve-se ao facto de estas células serem isoladas de um tecido em desenvolvimento (papila apical), representando uma população de células progenitoras precoces, contendo propriedades superiores para a regeneração de tecidos (George T.-J. Huang *et al.*, 2008; Sonoyama *et al.*, 2008; W. Wang *et al.*, 2016).

Através da papila apical a obtenção de células estaminais adultas é superior ao adquirido da polpa dentária madura. Por esta razão acredita-se que as SCAP recolhidas a partir de um único dente são susceptíveis de fornecer células suficientes para o transplante humano e enquadrar-se melhor num cenário clínico (Kim Hynes *et al.*, 2012; Morsczeck *et al.*, 2008).

2.4.5 DFPCs

O folículo dentário é um tecido conjuntivo laxo derivado de células ectomesenquimais, que se forma no estadio de capuz e localiza-se em redor do gérmen dentário em desenvolvimento. O folículo dentário parece desempenhar um papel crucial na génese de todos os constituintes do periodonto e é nele que podem ser isoladas células progenitoras importantes à formação do periodonto, as DFPCs (Estrela *et al.*, 2011; Honda *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014; Ulmer *et al.*, 2010).

As primeiras DFPCs humanas foram isoladas em 2005 por Morsczeck *et al.*, a partir de terceiros molares em desenvolvimento (Maxim *et al.*, 2015; Otsu *et al.*, 2014).

Como todas as outras células estaminais, as DFPCs apresentam-se como multipotentes, embora ainda não seja bem claro quais os tipos celulares em que podem diferenciar-se *in vitro*. Parece ser concordante entre a maioria dos estudos a capacidade de diferenciação osteogénica, cementogénica e adipogénica, no entanto, a diferenciação neurogénica e condrogénica foi constatada em muito poucos estudos. Estas variações a respeito da

multipotência das DFPCs parece estar associado ao isolamento destas de diferentes espécies e/ou em diferentes estádios de desenvolvimento do gérmen dentário (por exemplo, estágio de formação da coroa ou formação da raiz) (Honda *et al.*, 2010).

Quando as DFSCs e DPSCs são comparadas, observa-se que as DFSCs proliferam mais rapidamente, exibem um maior potencial para formar adipócitos e um menor potencial para formar condrócitos e osteoblastos em relação às DPSCs (Şahin *et al.*, 2016).

Vários estudos sugerem a potencialidade das DFPCs na regeneração do periodonto *in vivo*. Um deles é o estudo de Yokoi *et al.* (2007), onde transplantaram subcutaneamente DFPCs imortalizadas de ratinho em outros ratinhos imunocomprometidos. Como resultado após 4 semanas observaram a formação de tecido ósseo e tecido fibroso semelhante ao LPD contendo fibrilhas densas de colagénio tipo I. Para além desta constatação, a estrutura formada semelhante ao LPD, mostrou expressar *periostin* (marcador de pré-osteoblastos, encontrado no perióstio e LPD), *scleraxis* (marcador de células progenitoras de tecidos tendinosos) e colagénio tipo XII, validando assim a possível capacidade das DFPCs diferenciarem-se em LPD *in vivo* (Bassir *et al.*, 2016; Peng *et al.*, 2009; Yokoi *et al.*, 2007).

Outro estudo que suporta o potencial das DFPCs na formação do LPD é o de Guo *et al.* (2012), mas desta vez recorrendo a DFPCs de terceiros molares humanos impactados e implantadas subcutaneamente no dorso de ratinhos. A formação de um complexo cimento/ligamento periodontal foi observada 6 semanas após a transplantação (Bassir *et al.*, 2016; Guo, Chen, *et al.*, 2012).

No mesmo ano, Guo *et al.* foi ainda mais longe no estudo da potencialidade das DFPCs. Curiosamente, as DFPCs quando implantadas num alvéolo dentário em combinação com *scaffold* de matriz de dentina (TDM), contribuem para a formação de tecidos radiculares, nomeadamente um complexo polpa-dentina e ligamento periodontal, ligando a camada de cimento formada ao osso alveolar do hospedeiro (Figura 39). Através de análises imunohistoquímicas, constaram que os tecidos regenerados expressaram marcadores do complexo polpa-dentina (DMP1 e DSP) e do complexo cimento-LPD (COL-1 e *scleraxis*), reafirmando a construção bem sucedida da raiz do dente (Guo, Gong, *et al.*, 2012; Kim Hynes *et al.*, 2012).

O mesmo resultado não se verificou com a implantação das DFPCs noutros microambientes, sugerindo que o microambiente no qual as células estaminais são implantadas afecta a capacidade destas para formar tecidos diferentes. Este estudo não só

mostrou o potencial que as DFPCs têm na regeneração de raízes dentárias como também demonstrou que o alvéolo dentário exerce um efeito indutivo sobre a formação de raízes (Guo, Gong, *et al.*, 2012; Kim Hynes *et al.*, 2012).

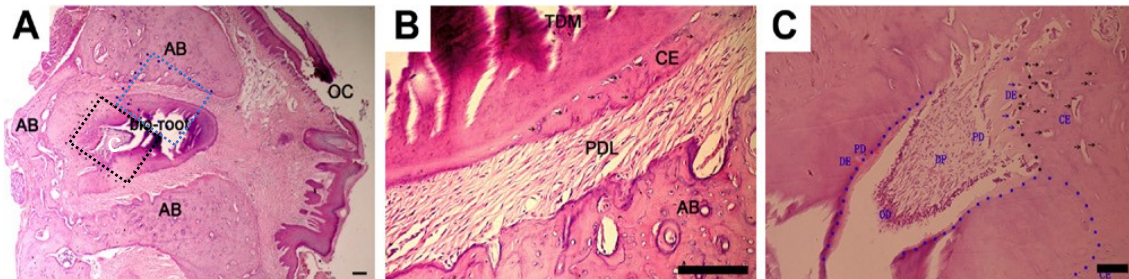


Figura 39 - Análise histológica da raiz dentária formada *in vivo*. A: Visão de menor ampliação; B e C: Ampliação das caixas a tracejado azul e preto em A, respectivamente. Em B observa-se o complexo ligamento periodontal (PDL)-cimento (CE) formado, onde o CE apresenta-se integrado com o *scaffold* TDM e observa-se o PDL perpendicularmente inserido no TDM e no osso alveolar (AB) do hospedeiro. Cementoblastos (setas pretas) presentes no CE. A imagem C mostra o complexo polpa dentária (DP)-dentina (DE) formado dentro do TDM. Adaptado de (Guo, Gong, *et al.*, 2012).

É de lembrar que no estudo de Park *et al.* (2011), já descrito anteriormente, a transplantação autóloga de DFPCs em defeitos periodontais criados cirurgicamente, em cães da raça Beagle, resultou na regeneração do defeito. Observaram não só a formação de novo cimento e osso alveolar, como também de fibras de Sharpey do ligamento periodontal. Segundo este estudo, as DFPCs ficam ainda um pouco em desvantagem comparativamente às PDLSCs no que toca às suas capacidades regenerativas periodontais, no entanto podem representar uma alternativa atraente às PDLSCs (Kim Hynes *et al.*, 2012; J.-Y. Park *et al.*, 2011).

Células estaminais dentárias	Expressão antígenos CD		Localização	Multipotência <i>in vitro</i>	Capacidade de formação de tecidos dentários <i>in vivo</i>
	+	-			
DPSCs	CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, CD271	CD14, CD19, CD24, CD31, CD34, CD45, CD117, CD133	Polpa de dentes permanentes	Odontoblastos, adipócitos, condrócitos, osteoblastos, miócitos, cardiomiócitos, células neuronais, hepatócitos e melanócitos	Complexo polpa-dentina e osso
SHED	CD13, CD29, CD44, CD56, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166	CD11b, CD14, CD19, CD34, CD43, CD45	Polpa de dentes decíduos esfoliados	Odontoblastos, osteoblastos, adipócitos, condrócitos, miócitos, células endoteliais e células neuronais	Dentina, osso e microvascularização
PDLSCs	CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166	CD14, CD31, CD34, CD45	Ligamento periodontal	Cementoblastos, osteoblastos, adipócitos, condrócitos e células neuronais	Cimento, LPD, osso alveolar
SCAP	CD13, CD24, CD29, CD44, CD49d, CD51, CD56, CD61, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166	CD14, CD18, CD34, CD45, CD117, CD150	Papila apical de raízes em desenvolvimento	Odontoblastos, osteoblastos, adipócitos e células neuronais	Complexo dentina-polpa
DFPCs	CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD53, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD271	CD31, CD34, CD45, CD133	Folículo dentário de dentes em desenvolvimento	Cementoblastos, osteoblastos, adipócitos, condrócitos e células neuronais	Cimento, LPD e osso alveolar

Tabela 4 - Características das células estaminais derivadas de tecidos dentários. Adaptado de (Egusa *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; J. Liu *et al.*, 2015).

2.5 Aplicações extra-orais das células estaminais dentárias

Desde a sua descoberta, as células estaminais dentárias começaram a ser largamente estudadas com o objectivo de alcançar-se a regeneração do complexo polpa-dentina e dos tecidos periodontais. No entanto, a importância das células estaminais dentárias não está confinada apenas a futuras aplicações no campo da regeneração de tecidos dentários. Devido às suas amplas capacidades de diferenciação, as células estaminais dentárias formaram um novo e atraente conjunto celular para terapias regenerativas de outros órgãos/tecidos e no tratamento de algumas patologias (Y.-J. Park *et al.*, 2016).

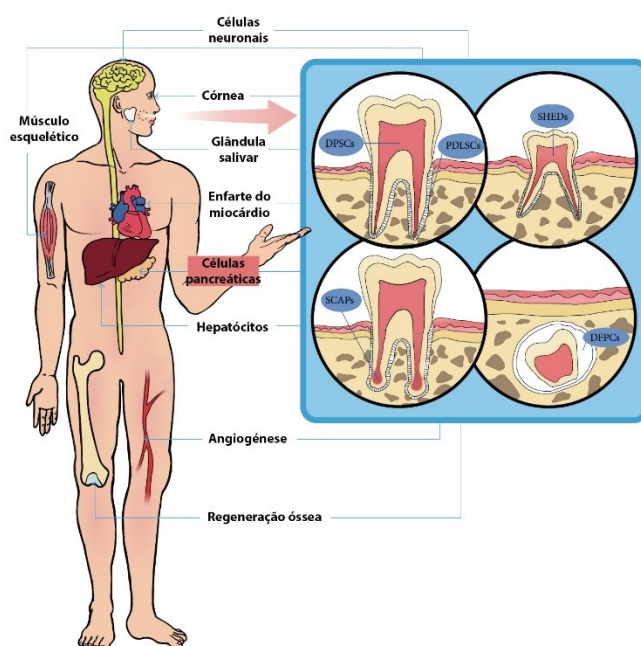


Figura 40 - Possível regeneração de vários tecidos ou órgãos recorrendo ao uso de células estaminais dentárias. Adaptado de (Y.-J. Park *et al.*, 2016).

As células estaminais da polpa dentária de dentes maduros e deciduos são as células estaminais dentárias largamente mais estudadas devido às suas características inigualáveis, ressaltando a sua eficiente capacidade de diferenciação osteo/dentinogénica, o que as torna uma ferramenta promissora para o tratamento de doenças dentárias e periodontais. No entanto, o seu potencial de multidiferenciação noutras linhagens celulares tem vindo a acrescer evidências da capacidade destas células em formar/reparar tecidos extra-orais (Aurrekoetxea *et al.*, 2015).

São crescentes os estudos que demonstram a potencialidade das DPSCs e SHED em terapias celulares e Engenharia de Tecidos, nomeadamente na regeneração óssea,

reparação da córnea, e no possível tratamento de doenças degenerativas como a doença de Alzheimer, enfarto do miocárdio, diabetes mellitus, lesões da medula espinhal, entre outras (Kabir *et al.*, 2014). Neste sentido, irei focar alguns dos estudos mais significativos efectuados com as DPSCs e SHED, apesar de as restantes células estaminais dentárias revelar-se prometedoras no mesmo âmbito.

São inúmeros os estudos que relatam o potencial osteogénico das DPSCs *in vitro*. No entanto, ainda é um pouco limitado o número de estudos *in vivo* referente às suas capacidades regenerativas ósseas (Morad *et al.*, 2013)..

Como já destacado no capítulo anterior, as DPSCs parecem ter a habilidade de regenerar osso orofacial. Contudo, as suas capacidades osteoregenerativas também se verificam em defeitos cranianos, como é demonstrado nos estudos realizados por Riccio *et al.* (2012) e Maraldi *et al.* (2013) (Morad *et al.*, 2013).

Em ambos os estudos criaram dois defeitos cranianos simétricos e com as mesmas dimensões, em cada região parietal, de vários ratos. Nesses defeitos cranianos foram implantas DPSCs humanas em *scaffolds*, enquanto que noutros foram implatados apenas *scaffolds* sem células, para controlo. Alguns defeitos não foram tratados e assim auxiliaram também como controlo. Após 4 semanas, em ambos os estudos, foi possível constatar radiograficamente e histologicamente maior reparação óssea no *scaffold* contendo as DPSCs, enquanto que o *scaffold* sem células resultou numa formação óssea mais incompleta. Já os defeitos ósseos não tratados foi observado formação de tecido conjuntivo, consistente com a falha de reparação do defeito ósseo (Maraldi *et al.*, 2013; Riccio *et al.*, 2012).

Um dado promissor observado apenas no estudo de Riccio *et al.* (2012), foi a união muito eficiente do novo osso formado com a margem do osso do hospedeiro, nos defeitos implantados com DPSCs em *scaffold* (Riccio *et al.*, 2012).

As DPSCs não são as únicas células estaminais dentárias a dar provas da sua potencialidade regenerativa óssea. Contrariamente ao relatado no estudo pioneiro de Miura *et al.* (2003), as SHED não só induzem outras células a diferenciarem-se em células osteogénicas, mas também contribuem activamente para a formação óssea (de Mendonca Costa *et al.*, 2008; B. M. Seo *et al.*, 2008).

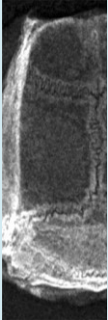
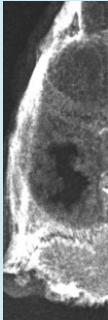
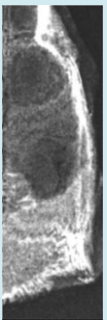

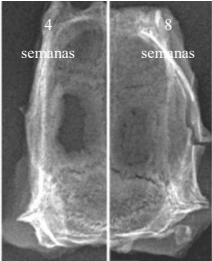
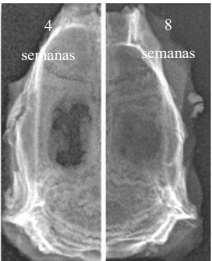
Artigo	Fonte celular	Scaffold	Resultados		
			Osso intacto	Scaffold	Scaffold+DPSCs
(Riccio et al., 2012)	hDPSCs	Fibroína			
(Maraldi et al., 2013)	hDPSCs	Colagénio	Osso intacto	Osso s/implante	Scaffold
					

Tabela 5 - Análise radiográfica da calota craniana de ratos 4 a 8 semanas após a cirurgia. Adaptado de (Maraldi *et al.*, 2013; Riccio *et al.*, 2012).

O infarto do miocárdio é uma das doenças que causa elevados números de mortalidade por todo o mundo. A capacidade de diferenciação das DPSCs em cardiomiócitos, *in vitro*, tem despoletado interesse dos investigadores no sentido de encontrar uma alternativa aos tratamentos já existentes para esta condição (Verma *et al.*, 2014).

Um dos estudos que visou conhecer o potencial terapêutico das DPSCs no reparo do infarto do miocárdio foi o de Gandia *et al.* (2008), onde observou que houve uma melhoria da função cardíaca e uma redução do tamanho do infarto, nos ratos tratados com DPSCs, quatro semanas após a injeção destas na zona lesada. Curiosamente, essa melhora não parece estar relacionada com a diferenciação das DPSCs em cardiomiócitos, mas sim por estas células favorecerem a angiogénese nos animais tratados com as DPSCs (Kabir *et al.*, 2014).

As DPSCs parecem ter um papel significativo na reconstrução da córnea. Num estudo realizado em coelhos sujeitos a queimaduras químicas oculares, foi transplantado diretamente sobre a córnea danificada, uma “folha” contendo DPSCs humanas e depois

coberta com membrana amniótica humana. Três meses depois, a transparência corneana dos olhos submetidos ao transplante de DPSC apresentou-se clinicamente melhorada, enquanto que os animais controle desenvolveram conjuntivalização total e opacificação. A análise histológica confirmou a formação de um epitélio corneano organizado e saudável, nos olhos transplantados com DPSCs humanas (Kabir *et al.*, 2014; Verma *et al.*, 2014).

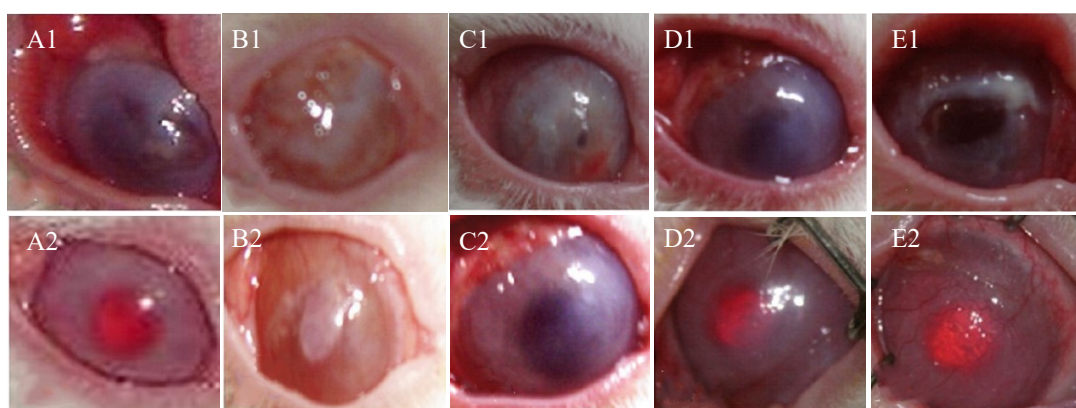


Figura 41 - Fotografias representativas dos olhos dos coelhos um mês após as queimaduras oculares (A1-E1) e três meses após o transplante da folha de engenharia de tecidos contendo DPSCs humanas (A2-E2). Adaptado de (Gomes *et al.*, 2010).

São vários os estudos que demonstram a competência das DPSCs na regeneração da medula espinal danificada. Sakai *et al.* (2012), procedeu ao transplante de células estaminais dentárias humana (DPSCs e SHED), para a medula espinal de ratos adultos, completamente transectada. Notavelmente, os animais que receberam SHED ou DPSCs exibiram uma recuperação marcada das funções locomotoras dos membros posteriores, em comparação com ratos controle transplantados com BMSC, fibroblastos ou PBS (tampão fosfato-salino). 5 semanas após a operação, os ratos que receberam DPSCs e SHED conseguiram mover 3 articulações do membro posterior de forma coordenada e andar sem suporte de peso. Já os ratos controle exibiram apenas movimentos sutis de 1 a 2 articulações (Kabir *et al.*, 2014; Verma *et al.*, 2014).

Este estudo revelou ainda que as células estaminais dentárias usadas promoveram a regeneração de axônios transectados devido à inibição direta de inibidores do crescimento axônico e pelo bloqueio da apoptose de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Além disso, as DPSCs e SHED também diferenciaram-se em oligodendrócitos maduros para substituir as células que foram perdidas (Kabir *et al.*, 2014; Verma *et al.*, 2014).

O estudo realizado por De Almeida *et al.* (2011) consolida a possibilidade do uso das DPSCs em terapias de reparação medular. Neste estudo os ratinhos foram submetidos a

laminectomia na T9 e submetidos compressão da medula espinhal com grampo vascular, durante 1 min. As DPSCs humanas foram transplantadas 7 dias (fase aguda) ou 28 dias (fase crónica), após a lesão. Os animais transplantados com DPSCs mostraram uma melhor preservação da substância branca, expressão mais elevada de factores neurotróficos (que ajudam no crescimento, manutenção e diferenciação dos neurónios) e a presença de inúmeros axónios mielinizados por células de Schwann ou oligodendrócitos, num tecido estruturalmente organizado. Por outro lado, a análise funcional também demonstrou uma melhoria significativa na locomoção dos ratinhos transplantados com DPSCs, comparativamente aos ratinhos controlo (de Almeida *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2014).

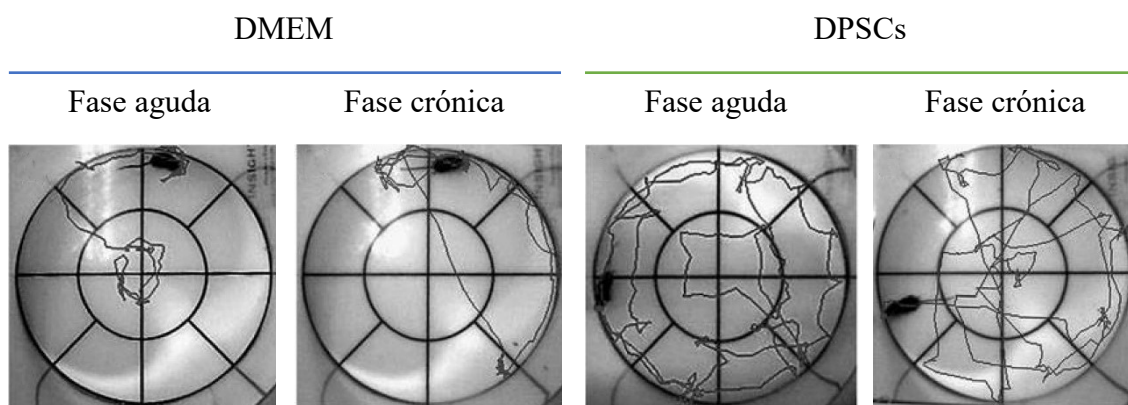


Figura 42 - Resultados da análise funcional dos grupos DMEM (controlo) e HDPC, 35 dias após o tratamento. Adaptado de (de Almeida *et al.*, 2011).

A diabetes tipo 1 caracteriza-se como sendo uma doença degenerativa, em que a destruição das células β do pâncreas leva a uma diminuição da produção de insulina e consequente hiperglicemia (Govindasamy *et al.*, 2011; Kabir *et al.*, 2014).

A terapêutica de transplante das ilhotas pancreáticas (ilhotas de *Langerhans*) de um dador parece ser uma possível cura para a diabetes tipo 1, no entanto a falta de órgãos doadores suficientes e os efeitos colaterais da terapia imunossupressora limitam seu uso terapêutico. Neste sentido a procura por alternativas terapêuticas levou aos investigadores a experimentos com vários tipos de células estaminais, nomeadamente as DPSCs (Govindasamy *et al.*, 2011; Kabir *et al.*, 2014)..

Um estudo realizado em 2011 propôs-se a tentar diferenciar as DPSCs humanas em células β do pâncreas. A confirmação dessa diferenciação foi adquirida após 10 dias, não só pelas alterações fenotípicas observadas, mas também pela presença de coloração

positiva com um marcador selectivo das células β e pela expressão significativa de factores de transcrição específicos das células pancreáticas. Surpreendentemente as células β diferenciadas quando estimuladas *in vitro* pela a adição de glicose, produzem insulina e péptido-C (Govindasamy *et al.*, 2011).

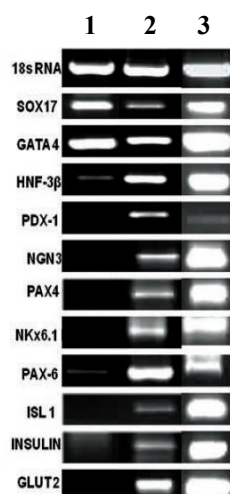


Figura 43 - RT-PCR de marcadores de células pancreáticas. 1: DPSCs indiferenciadas; 2: 10 dias após estimulação com meio de cultura para diferenciação em células pancreáticas; 3: pâncreas humano (controlo). Adaptado de (Govindasamy *et al.*, 2011).

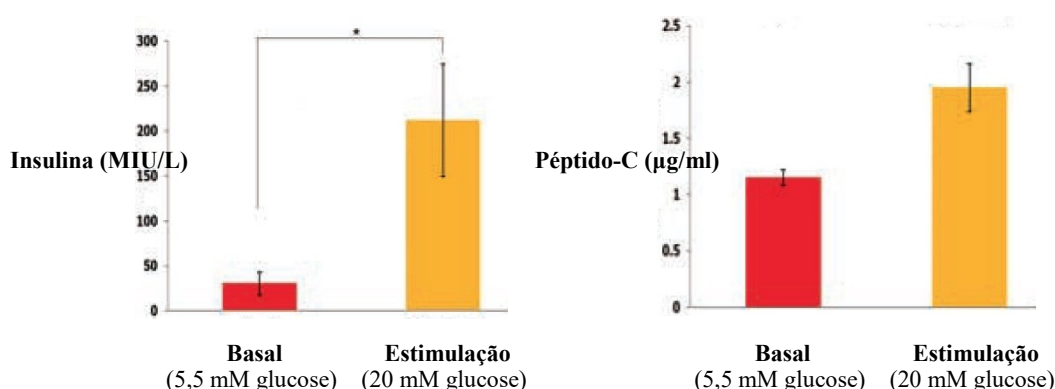


Figura 44 - Gráficos quantitativos de insulina e péptido-C produzidos pelas células diferenciadas em ilhotas pancreáticas, após estimulação com glicose. Adaptado de (Govindasamy *et al.*, 2011).

Este estudo *in vitro* revelou-se de extrema importância para uma futura abordagem *in vivo*. Assim em 2013, um estudo focou-se na diferenciação comparativa entre as SHED e as DPSCs em células de ilhotas pancreáticas e nas suas capacidades secretoras de insulina, tanto *in vitro* como em ratinhos diabéticos induzidos (Kanafi *et al.*, 2013).

Ao final de 10 dias, em meio de diferenciação, tanto as SHED como as DPSCs diferenciaram-se efetivamente em células β e quando estimuladas *in vitro* com glicose, respondem positivamente secretando insulina (Kanafi *et al.*, 2013).

A diferenciação das SHED produziu mais células β e maior libertação de insulina, comparativamente às DPSCs. Neste sentido, a células β derivadas das SHED foram as

escolhidas para dar seguimento ao estudo *in vivo*. Cerca de 90% dos ratos diabéticos que foram transplantados com células β derivadas das SHED sobreviveram e passadas 2 semanas as concentrações de glucose no sangue reduziram para valores normais, mantendo-se a normoglicemia após 2 meses (Kanafi *et al.*, 2013).

Estes resultados demonstram pela primeira vez que tanto as DPSCs como as SHED oferecem uma fonte alternativa e não controversa de tecido humano que poderá ser usada para terapêutica da diabetes.

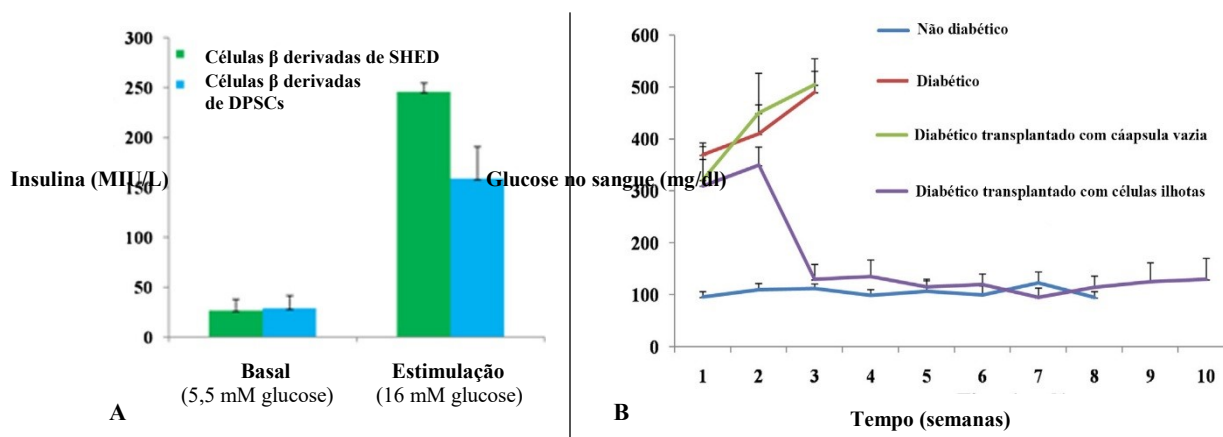


Figura 45 - Gráficos representativos do número de células β obtidas pela diferenciação de SHED e DPSCs (A) e a comparação de glucose no sangue nos ratos controlo e nos ratos transplantados com células β (B). Adaptado de (Kanafi *et al.*, 2013).

É consensual entre vários estudos a capacidade das DPSCs e das SHED em diferenciarem-se, *in vitro*, em células com características morfológicas, fenotípicas e funcionais de hepatócitos (Ishkitiev *et al.*, 2012; Verma *et al.*, 2014). Após estas constatações outros estudos surgiram para avaliar a capacidade das SHED na terapêutica de ratinhos com fibrose hepática. Os resultados dos estudos indicaram que o transplante de SHED reprime a deposição fibrosa por supressão da activação das células estreladas hepáticas (o que impede a transdiferenciação destas em miofibroblatos) e exhibe efeitos anti-fibróticos e anti-inflamatórios. Além disso, observaram que as SHED transplantadas diferenciam-se espontaneamente em hepatócitos, substituindo o tecido hepático danificado. Estes dados sugerem que as células estaminais dentárias podem fornecer benefícios terapêuticos para o tratamento da fibrose hepática (Hirata *et al.*, 2016; Yamaza *et al.*, 2015).

As distrofias musculares (MDs) são doenças genéticas que causam fraqueza progressiva e degeneração dos músculos esqueléticos.

As DPSCs induzidas adequadamente, *in vitro*, adquirem diferenciação em células endoteliais, células de músculo liso e em células de músculo esquelético. Esta trilogia dá destaque às DPSCs para possível aplicação terapêutica nas distrofias musculares. Apesar de ainda não serem bem claros os mecanismos interventivos das DPSCs, quando injectadas intramuscularmente em ratinhos distróficos, observa-se um aumento geral da revascularização, regeneração de fibras musculares e diminuição da fibrose (Martínez-Sarrà *et al.*, 2017).

A doença de Alzheimer e doença de Parkinson são as patologias neurodegenerativas mais comuns e que actualmente a terapêutica é apenas sintomática.

As DPSCs apresentam em vários estudos benefícios potenciais e perspectivas relativamente promissoras para aplicação clínica na prevenção e tratamento da doença de Alzheimer. Um desses estudos é o de Wang *et al.* (2017), onde as DPSCs, de origem humana, foram co-cultivadas, *in vitro*, com um modelo celular da doença de Alzheimer, induzido por ácido okadaico (OA), um inibidor da desfosforilação da proteína Tau e promotor da hiperfosforilação. Um dos processos fisiopatológicos que ocorre na doença de Alzheimer é precisamente a hiperfosforilação da proteína Tau, que resulta na instabilidade dos microtúbulos e danos no citosqueleto dos neurónios. Como consequência ocorre uma diminuição da atividade neuronal e possível apoptose dos mesmos. Este estudo exibiu que o tratamento com DPSCs restaurou a morfologia alongada dos prolongamentos dendríticos e os microtúbulos apresentavam-se espessados e bem-dispostos. Enquanto que o modelo não tratado, os dendritos dos axónios encontravam-se retraídos ou até mesmo desaparecidos e os microtúbulos desordenados. Outras constatações observadas no grupo modelo cultivado com DPSCs foi a diminuição da apoptose e a supressão significativa da fosforilação da proteína Tau. O que sugere que as DPSCs secreta uma variedade de factores de crescimento que antagoniza a fosforilação da Tau, sendo importante para manter a estabilidade do sistema nervoso (Verma *et al.*, 2014; F. Wang *et al.*, 2017).

A doença de Parkinson caracteriza-se pela perda de neurónios dopaminérgicos da substância nigra, levando a sintomas de tremor, rigidez e bradicinesia.

Tanto as DPSCs como as SHED já demonstraram inúmeras provas da sua capacidade de diferenciação em células neuronais. Neste sentido, as DPSCs e as SHED são propostas como uma possível estratégia para abrandar ou substituir a perda neuronal desta doença. As investigações progrediram na tentativa, bem-sucedida, da diferenciação destas células em neurónios do tipo dopaminérgico, *in vitro* e *in vivo*. Aquando da transplantação em ratinhos modelo, observa-se melhorias comportamentais e recuperação de neurónios danificados. Todos estes resultados sugerem que as células estaminais dentárias têm potencialidade para aplicação clínica na prevenção e tratamento de várias doenças neurodegenerativas (Gnanasegaran *et al.*, 2017; J. Wang *et al.*, 2010).

III. Conclusão

Como se pode constatar através desta revisão bibliográfica, a cavidade oral encontra-se repleta de estruturas enriquecidas em células estaminais mesenquimais. De uma forma geral, todas as células estaminais dentárias apresentam uma capacidade elevada de proliferação e multipotência, à semelhança de outras MSCs, mas com a vantagem acrescida de serem obtidas com maior facilidade e de forma minimamente invasiva.

Os resultados dos estudos *in vivo* aqui apresentados são encorajadores no que diz respeito ao uso das células estaminais dentárias como ferramenta terapêutica no ramo da medicina dentária regenerativa. As DPSCs, SHED e SCAP revelaram grande aptidão na formação de tecido pulpo-dentinário, o que as torna fortes candidatos para uma abordagem endodontia regenerativa em substituição da endodontia convencional. Já as PDLSCs e DFSCs parecem desempenhar uma excelente ajuda no que cabe à regeneração dos tecidos periodontais.

Como também pudemos constatar, graças às suas habilidades multipotenciais, a investigação das células estaminais dentárias alargou-se a outros órgãos/tecidos extra-orais. Os resultados são prometedores, mas para já é mais expectante uma abordagem próxima e efectiva no uso destas células para terapias ósseas regenerativas, do que para outras abordagens extra-orais.

Embora os avanços científicos com as células estaminais dentárias progridam de forma considerável e sustentada, a sua reprodutibilidade em ensaios clínicos é ainda escassa. Existe ainda muito trabalho na tradução dos inúmeros dados dos estudos *in vitro* e em animais para que se consiga uma maior aplicabilidade em estudos clínicos. No entanto, há que valorizar todos os conhecimentos até agora adquiridos e ter em conta as possibilidades excitantes do uso destas células na Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa dentro da cavidade oral e em outras partes do corpo.

Desta maneira, os médicos dentistas devem actualizar-se, informar os seus pacientes e sensibiliza-los para a possibilidade da recolha das células estaminais durante tratamentos dentários convencionais, uma vez que desde 2016, que em Portugal, estas células já podem ser isoladas e criopreservadas, em bancos acreditados, e usadas numa terapêutica autóloga futura.

IV. Bibliografia

- Amrollahi, P., Shah, B., Seifi, A., & Tayebi, L. (2016). Recent advancements in regenerative dentistry: A review. *Materials Science and Engineering C*.
- Aurrekoetxea, M., Garcia-Gallastegui, P., Irastorza, I., Luzuriaga, J., Uribe-Etxebarria, V., Unda, F., & Ibarretxe, G. (2015). Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues. *Frontiers in Physiology*, 6(OCT), 1–10.
- Avery, J. k. (2002). *Oral development and histology* (3ª Edição,). Thieme.
- Bakopoulou, A., & About, I. (2016). Stem Cells of Dental Origin: Current Research Trends and Key Milestones towards Clinical Application. *Stem Cells International*, 2016, 1–20.
- Bassir, S. H., Wisitrasameewong, W., Raanan, J., Ghaffarigarakani, S., Chung, J., Freire, M., ... Intini, G. (2016). Potential for Stem Cell-Based Periodontal Therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), 50–61.
- Batouli, S., Miura, M., & Brahim J. (2003). Comparison of stem-cell- mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*, 82, 976–981.
- Berkovitz, B. K. B., Holland, G. R., & Moxham, B. J. (2004). *Anatomia, embriologia e histologia bucal* (3ª Edição,). Artmed.
- Bossú, M., Pacifici, A., Carbone, D., Tenore, G., Ierardo, G., Pacifici, L., & Polimeni, A. (2014). Today prospects for tissue engineering therapeutic approach in dentistry. *Scientific World Journal*, 2014.
- Brand, R. W., Isselhard, D. E., & Satin, E. (2013). *Anatomy of Orofacial Structures: A Comprehensive Approach* (7ª Edição,). Elsevier.
- Brignier, A. C., & Gewirtz, A. M. (2010). Embryonic and adult stem cell therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2), S336–S344.
- Cao, Y., Song, M., Kim, E., Shon, W., Chugal, N., Bogen, G., ... Kang, M. K. (2015). Pulp-dentin Regeneration: Current State and Future Prospects. *Journal of Dental Research*, 94(11), 1544–1551.
- Chiego, D. J. (2014). *Principios de histología y embriología bucal: Con orientación clínica* (4ª Edição). Elsevier.
- Choumerianou, D. M., Dimitriou, H., & Kalmanti, M. (2008). Stem cells: promises versus limitations. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 14(1), 53–60.

- Cordeiro, M. M., Dong, Z., Kaneko, T., Zhang, Z., Miyazawa, M., Shi, S., ... Nör, J. E. (2008). Dental Pulp Tissue Engineering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. *Journal of Endodontics*, 34(8), 962–969.
- D'Aquino, R., De Rosa, A., Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., Graziano, A., ... Papaccio, G. (2009). Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *European Cells and Materials*, 18, 75–83.
- de Almeida, F. M., Marques, S. A., Ramalho, B. dos S., Rodrigues, R. F., Cadilhe, D. V., Furtado, D., ... Martinez, A. M. B. (2011). Human Dental Pulp Cells: A New Source of Cell Therapy in a Mouse Model of Compressive Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*, 28(9), 1939–1949.
- de Mendonca Costa, A., Bueno, D. F., Martins, M. T., Kerkis, I., Kerkis, A., Fanganiello, R. D., ... Passos-Bueno, M. R. (2008). Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 19(1), 204–210.
- Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I., & Akiyama, K. (2012). Stem cells in dentistry - Part I: Stem cell sources. *Journal of Prosthodontic Research*, 56(3), 151–165.
- Estrela, C., de Alencar, A. H. G., Kitten, G. T., Vencio, E. F., & Gava, E. (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: Perspectives for tissue regeneration. *Brazilian Dental Journal*, 22(2), 91–98.
- Ferraris, M. E. G. de, & Muñoz, A. C. (2009). *Histologia, Embriologia E Engenharia Tissular Bucodental* (3ª Edição.). Panamericana.
- Giuliani, A., Manescu, A., Langer, M., Rustichelli, F., Desiderio, V., Paino, F., ... Papaccio, G. (2013). Three Years After Transplants in Human Mandibles, Histological and In-Line Holotomography Revealed That Stem Cells Regenerated a Compact Rather Than a Spongy Bone: Biological and Clinical Implications. *STEM CELLS Translational Medicine*, 2(4), 316–324.
- Gnanasegaran, N., Govindasamy, V., Simon, C., Gan, Q. F., Vincent-Chong, V. K., Mani, V., ... Abu Kasim, N. H. (2017). Effect of dental pulp stem cells in MPTP-induced old-aged mice model. *European Journal of Clinical Investigation*, 47(6), 403–414.
- Gomes, J. Á. P., Monteiro, B. G., Melo, G. B., Smith, R. L., da Silva, M. C. P., Lizier, N. F., ... Kerkis, I. (2010). Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets

- composed of human immature dental pulp stem cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(3), 1408–1414.
- Govindasamy, V., Ronald, V. S., Abdullah, a N., Nathan, K. R. G., Ab Aziz, Z. a C., Abdullah, M., ... Bhonde, R. R. (2011). Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates. *Journal of Dental Research*, 90(5), 646–652.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630.
- Guo, W., Chen, L., Gong, K., Ding, B., Duan, Y., & Jin, Y. (2012). Heterogeneous dental follicle cells and the regeneration of complex periodontal tissues. *Tissue Engineering. Part A*, 18(5–6), 459–470.
- Guo, W., Gong, K., Shi, H., Zhu, G., He, Y., Ding, B., ... Jin, Y. (2012). Dental follicle cells and treated dentin matrix scaffold for tissue engineering the tooth root. *Biomaterials*, 33(5), 1291–1302.
- Hirata, M., Ishigami, M., Matsushita, Y., Ito, T., Hattori, H., Hibi, H., ... Yamamoto, A. (2016). Multifaceted Therapeutic Benefits of Factors Derived From Dental Pulp Stem Cells for Mouse Liver Fibrosis. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(10), 1416–1424.
- Honda, M. J., Imaizumi, M., Tsuchiya, S., & Morszeck, C. (2010). Dental follicle stem cells and tissue engineering. *Journal of Oral Science*, 52(4), 541–552.
- Huang, G. T.-J., Sonoyama, W., Liu, Y., Liu, H., Wang, S., & Shi, S. (2008). The Hidden Treasure in Apical Papilla: The Potential Role in Pulp/Dentin Regeneration and BioRoot Engineering. *Journal of Endodontics*, 34(6), 645–651.
- Huang, G. T.-J., Yamaza, T., Shea, L. D., Djouad, F., Kuhn, N. Z., Tuan, R. S., & Shi, S. (2010). Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Engineering. Part A*, 16(2), 605–615.
- Hynes, K., Menicanin, D., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2012). Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 59(1), 203–227.
- Hynes, K., Menichanin, D., Bright, R., Ivanovski, S., Hutmacher, D. W., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2015). Induced Pluripotent Stem Cells: A new Frontier For Stem Cells in Dentistry. *Journal of Dental*, 94(11), 1508–1515.
- Inanç, B., & Elçin, Y. M. (2011). Stem Cells in Tooth Tissue Regeneration-Challenges

- and Limitations. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(3), 683–692.
- Iohara, K., Imabayashi, K., Ishizaka, R., Watanabe, A., Nabekura, J., Ito, M., ... Nakashima, M. (2011). Complete Pulp Regeneration After Pulpectomy by Transplantation of CD105 + Stem Cells with Stromal Cell-Derived Factor-1. *Tissue Engineering Part A*, 17(15–16), 1911–1920.
- Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Imai, T., Tanaka, T., Nakahara, T., Ishikawa, H., ... Haapasalo, M. (2012). High-purity hepatic lineage differentiated from dental pulp stem cells in serum-free medium. *Journal of Endodontics*, 38(4), 475–480.
- Jain, A., & Bansal, R. (2015). Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 6(1), 29.
- Kabir, R., Gupta, M., Aggarwal, A., Sharma, D., Sarin, A., & Kola, M. Z. (2014). Imperative Role of Dental Pulp Stem Cells in Regenerative Therapies: A Systematic Review. *Nigerian Journal of Surgery : Official Publication of the Nigerian Surgical Research Society*, 20(1), 1–8.
- Kanafi, M. M., Rajeshwari, Y. B., Gupta, S., Dadheech, N., Nair, P. D., Gupta, P. K., & Bhonde, R. R. (2013). Transplantation of islet-like cell clusters derived from human dental pulp stem cells restores normoglycemia in diabetic mice. *Cytotherapy*, 15(10), 1228–1236.
- Katchburian, E., & Arana, V. (2017). *Histologia e Embriologia Oral* (4ª Edição). Guanabara Koogan.
- Kim, S., Shin, S. J., Song, Y., & Kim, E. (2015). In Vivo Experiments with Dental Pulp Stem Cells for Pulp-Dentin Complex Regeneration. *Mediators of Inflammation*.
- Kodonas, K., Gogos, C., Papadimitriou, S., Kouzi-Koliakou, K., & Tziafas, D. (2012). Experimental formation of dentin-like structure in the root canal implant model using cryopreserved swine dental pulp progenitor cells. *Journal of Endodontics*, 38(7), 913–919.
- Kumar, G. S. (2011). *Orban's oral histology and embryology* (13ª Edição). Elsevier.
- La Noce, M., Paino, F., Spina, A., Naddeo, P., Montella, R., Desiderio, V., ... Laino, L. (2014). Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *Journal of Dentistry*, 42(7), 761–768.
- Lanza, R., & Atala, A. (2013). *Essentials of STEM CELL BIOLOGY* (3ª Edição). Academic Press.
- Ledesma-Martinez, E., Mendoza-Nunez, V. M., & Santiago-Ororio, E. (2016).

- Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells International*, 2016, 4709572.
- Leeb, C., Jurga, M., McGuckin, C., Forraz, N., Thallinger, C., Moriggl, R., & Kenner, L. (2011). New perspectives in stem cell research: Beyond embryonic stem cells. *Cell Proliferation*, 44(SUPPL. 1), 9–14.
- Li, Y., Shu, L.-H., Yan, M., Dai, W.-Y., Li, J.-J., Zhang, G.-D., & Yu, J.-H. (2014). Adult stem cell-based apexogenesis. *World Journal of Methodology*, 4(2), 99–108.
- Liu, H., & Cao, T. (2010). Dental application potential of mesenchymal stromal cells and embryonic stem cells. *The Chinese Journal of Dental Research: The Official Journal of the Scientific Section of the Chinese Stomatological Association (CSA)*, 13(2), 95–103.
- Liu, J., Yu, F., Sun, Y., Jiang, B., Zhang, W., Yang, J., ... Liu, S. (2015). Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS*, 33(3), 627–638.
- Liu, Y., Zheng, Y., Ding, G., Fang, D., Zhang, C., Bartold, P. M., ... Wang, S. (2008). Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(4), 1065–1073.
- Maraldi, T., Riccio, M., Pisciotta, A., Zavatti, M., Carnevale, G., Beretti, F., ... De Pol, A. (2013). Human amniotic fluid-derived and dental pulp-derived stem cells seeded into collagen scaffold repair critical-size bone defects promoting vascularization. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(3), 53.
- Martínez-Sarrà, E., Montori, S., Gil-Recio, C., Núñez-Toldrà, R., Costamagna, D., Rotini, A., ... Sampaolesi, M. (2017). Human dental pulp pluripotent-like stem cells promote wound healing and muscle regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*, 8, 175.
- Maxim, M. A., Soritau, O., Baciut, M., Bran, S., & Baciut, G. (2015). The role of dental stem cells in regeneration. *Clujul Medical (1957)*, 88(4), 479–482.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5807–5812.
- Morad, G., Kheiri, L., & Khojasteh, A. (2013). Dental pulp stem cells for in vivo bone regeneration: A systematic review of literature. *Archives of Oral Biology*, 58(12), 1818–1827.

- Morsczeck, C., Schmalz, G., Reichert, T. E., Völlner, F., Galler, K., & Driemel, O. (2008). Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clinical Oral Investigations*, 12(2), 113–118.
- Nakahara, T. (2011). Potential feasibility of dental stem cells for regenerative therapies: Stem cell transplantation and whole-tooth engineering. *Odontology*, 99(2), 105–111.
- Nanci, A. (2013). *Ten Cate's oral histology : development, structure, and function*. (8ª Edição,). Elsevier.
- Nör, J. E. (2006). Tooth regeneration in operative dentistry. *Operative Dentistry*, 31(6), 633–642.
- Otsu, K., Kumakami-Sakano, M., Fujiwara, N., Kikuchi, K., Keller, L., Lesot, H., & Harada, H. (2014). Stem cell sources for tooth regeneration: Current status and future prospects. *Frontiers in Physiology*, 5 FEB(February), 1–10.
- Papaccio, G., Graziano, A., D'Aquino, R., Graziano, M. F., Pirozzi, G., Menditti, D., ... Laino, G. (2006). Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: A cell source for tissue repair. *Journal of Cellular Physiology*, 208(2), 319–325.
- Park, J.-Y., Jeon, S. H., & Choung, P.-H. (2011). Efficacy of Periodontal Stem Cell Transplantation in the Treatment of Advanced Periodontitis. *Cell Transplantation*, 20(2), 271–285.
- Park, Y.-J., Cha, S., & Park, Y.-S. (2016). Regenerative Applications Using Tooth Derived Stem Cells in Other Than Tooth Regeneration: A Literature Review. *Stem Cells International*, 2016, 1–12.
- Peng, L., Ye, L., & Zhou, X. (2009). Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *International Journal of Oral Science*, 1(1), 6–12.
- Piscaglia, A. C. (2008). Stem cells, a two-edged sword: Risks and potentials of regenerative medicine. *World Journal of Gastroenterology*, 14(27), 4273–4279.
- Riccio, M., Maraldi, T., Pisciotta, A., La Sala, G. B., Ferrari, A., Bruzzesi, G., ... De Pol, A. (2012). Fibroin Scaffold Repairs Critical-Size Bone Defects In Vivo Supported by Human Amniotic Fluid and Dental Pulp Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*, 18(9–10), 1006–1013.
- Rimondini, L., & Mele, S. (2009). Stem cell technologies for tissue regeneration in dentistry. *Minerva Stomatol*, 58(10), 483–499.
- Rodríguez-Lozano, F. J., Insausti, C. L., Iniesta, F., Blanquer, M., Ramírez, M. del C.,

- Meseguer, L., ... Moraleda, J. M. (2012). Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 17(6), 1062–1067.
- Rosa, V., Zhang, Z., Grande, R. H. M., & Nör, J. E. (2013). Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals. *Journal of Dental Research*, 92(11), 970–975.
- Şahin, F., Doğan, A., & Demirci, S. (2016). *Dental Stem Cells*. Cham: Springer International Publishing.
- Saito, M. T., Silvério, K. G., Casati, M. Z., Sallum, E. A., & Nociti, F. H. (2015). Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. *World Journal of Stem Cells*, 7(2), 399–407.
- Sedgley, C. M., & Botero, T. M. (2012). Dental Stem Cells and Their Sources. *Dental Clinics of North America*, 56(3), 549–561.
- Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., ... Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet (London, England)*, 364(9429), 149–155.
- Seo, B. M., Sonoyama, W., Yamaza, T., Coppe, C., Kikuri, T., Akiyama, K., ... Shi, S. (2008). SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Diseases*, 14(5), 428–434.
- Shilpa, P. S., Kaul, R., Sultana, N., & Bhat, S. (2013). Stem cells: Boon to dentistry and medicine. *Dental Research Journal*, 10(2), 149–154.
- Slack, J. M. W. (2012). *Essential developmental biology*. Wiley-Blackwell.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., & Huang, G. T.-J. (2008). Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study. *Journal of Endodontics*, 34(2), 166–171.
- Tatullo, M., Marrelli, M., Shakesheff, K. M., & White, L. J. (2015). Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(11), 1205–1216.
- Ulmer, F. L., Winkel, A., Kohorst, P., & Stiesch, M. (2010). Stem cells--prospects in dentistry. *Schweizer Monatsschrift Für Zahnmedizin = Revue Mensuelle Suisse d'odonto-Stomatologie = Rivista Mensile Svizzera Di Odontologia e Stomatologia / SSO*, 120(10), 860–883.
- Verma, K., Bains, R., Bains, V. K., Rawtiya, M., Loomba, K., & Srivastava, S. C. (2014).

- Therapeutic potential of dental pulp stem cells in regenerative medicine: An overview. *Dental Research Journal*, 11(3), 302–308.
- Wang, F., Jia, Y., Liu, J., Zhai, J., Cao, N., Yue, W., ... Pei, X. (2017). Dental pulp stem cells promote regeneration of damaged neuron cells on the cellular model of Alzheimer's disease. *Cell Biology International*, 41(6), 639–650.
- Wang, J., Wang, X., Sun, Z., Wang, X., Yang, H., Shi, S., & Wang, S. (2010). Stem Cells from Human-Exfoliated Deciduous Teeth Can Differentiate into Dopaminergic Neuron-Like Cells. *Stem Cells and Development*, 19(9), 1375–1383.
- Wang, W., Dang, M., Zhang, Z., Hu, J., Eyster, T. W., Ni, L., & Ma, P. X. (2016). Dentin regeneration by stem cells of apical papilla on injectable nanofibrous microspheres and stimulated by controlled BMP-2 release. *Acta Biomaterialia*, 36, 63–72.
- Wang, Y., Zhao, Y., Jia, W., Yang, J., & Ge, L. (2013). Preliminary study on dental pulp stem cell-mediated pulp regeneration in canine immature permanent teeth. *Journal of Endodontics*, 39(2), 195–201.
- Yamaza, T., Alatas, F. S., Yuniartha, R., Yamaza, H., Fujiyoshi, J. K., Yanagi, Y., ... Taguchi, T. (2015). In vivo hepatogenic capacity and therapeutic potential of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in liver fibrosis in mice. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 171.
- Yan, M., Yu, Y., Zhang, G., Tang, C., & Yu, J. (2010). A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth. *Stem Cell Reviews*, 7(1), 161–171.
- Yokoi, T., Saito, M., Kiyono, T., Iseki, S., Kosaka, K., Nishida, E., ... Teranaka, T. (2007). Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell and Tissue Research*, 327(2), 301–311.